



Espacenet

## Bibliographic data: JP 11500915 (T)

### Method for making heteromultimeric polypeptides

**Publication date:** 1999-01-26

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**

- international: **A61K38/00; A61K39/395; A61P31/04; A61P31/12; C07K14/73; C07K16/28; C07K16/46; C07K19/00; C12N15/09; C12N15/13; C12N5/10; C12P21/08; C12R1/91;** (IPC1-7): A61K38/00; A61K39/395; C07K16/46; C07K19/00; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/08; C12P21/08; C12R1/91

- European: C07K14/705B14; C07K16/28A12; C07K16/46; C07K16/46D; C07K19/00

**Application number:** JP19960526260T 19960205

**Priority number(s):** WO1996US01598 19960205; US19950399106 19950301

**Also published as:**

- JP 3775798 (B2)
- US 5807706 (A)
- ZA 9601635 (A)
- US 2010254986 (A1)
- US 2007014794 (A1)
- more

Abstract not available for JP 11500915 (T)

Abstract of corresponding document: US 5807706 (A)

The invention relates to a method of preparing heteromultimeric polypeptides such as bispecific antibodies, bispecific immunoadhesins and antibody-immunoadhesin chimeras. The invention also relates to the heteromultimers prepared using the method. Generally, the method involves introducing a protuberance at the interface of a first polypeptide and a corresponding cavity in the interface of a second polypeptide, such that the protuberance can be positioned in the cavity so as to promote heteromultimer formation and hinder homomultimer formation. "Protuberances" are constructed by replacing small amino acid side chains from the interface of the first polypeptide with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the protuberances are created in the interface of the second polypeptide by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). The protuberance and cavity can be made by synthetic means such as altering the nucleic acid encoding the polypeptides or by peptide synthesis.

Last updated: 26.04.2011 Worldwide Database 5.7.23. 92p

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/395	A D Z	A 6 1 K 39/395	A D Z
C 0 7 K 16/46		C 0 7 K 16/46	
19/00		19/00	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 95 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平8-526260	(71) 出願人	ジェネンテック インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成8年(1996) 2月5日		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 9月1日		-4990 サウス サンフランシスコ ポイ
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 0 1 5 9 8		ント サン ブルノ ブルヴァード 460
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 2 7 0 1 1	(72) 発明者	カーター, ポール ジェイ
(87) 国際公開日	平成8年(1996) 9月6日		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94116
(31) 優先権主張番号	0 8 / 3 9 9 , 1 0 6		サンフランシスコ エイティーンズ ア
(32) 優先日	1995年3月1日		ヴェニユ 2074
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(72) 発明者	プレスタ, レオナルド ジー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 94109
			サンフランシスコ ゴフ ストリート
			#206 1900
		(74) 代理人	弁理士 志賀 正武 (外1名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異種多量体ポリペプチド類の製造方法

(57) 【要約】

本発明は、二重特異的抗体、二重特異的イムノアドヘシン及び抗体-イムノアドヘシンキメラ等の異種多量体性ポリペプチドの製造方法に関する。本発明は該方法により調製された異種多量体にも関するものである。一般的に、該方法は第1のポリペプチドの境界部分に突起を導入し、かつ第2のポリペプチドの境界部分に対応する空隙を導入し、如かして突起が空隙内に配置され得るようにして異種多量体の形成を促進すると共に同種多量体の形成を阻害することを含む。“突起”は第1のポリペプチドの境界部分の小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換することにより構築される。第2のポリペプチドの境界部分には大きいアミノ酸側鎖をより小さいもの（例えば、アラニンまたはスレオニン）に置換することにより突起と同等またはより小さい補完的な“空隙”が作られる。突起及び空隙は、ポリペプチドをコードする核酸の改変またはペプチド合成等の合成的手段により作成されうる。

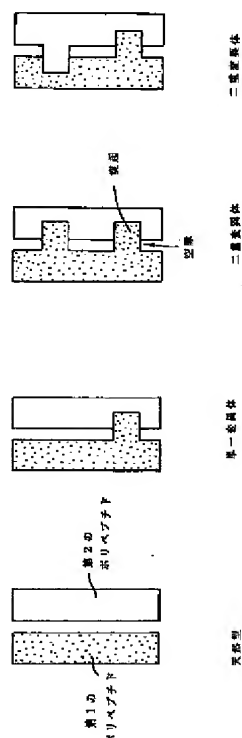


FIG. 4

【特許請求の範囲】

1. 境界部分において接触する第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチドは第2のポリペプチドの境界部分の空隙に位置させることができる突起を有する異種多量体の調製方法であって、工程：

(a) 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドをコードする核酸を有し、第1のポリペプチドをコードする該核酸が突起をコードするように元の核酸から改変されるか、または第2のポリペプチドをコードする核酸が空隙をコードするように元の核酸から改変され、あるいはその両者である宿主細胞を、該核酸が発現されるべく培養し；及び

(b) 宿主細胞培養物から該異種多量体を回収することを含む、異種多量体の調製方法。

2. 第1のポリペプチドをコードする該核酸が突起をコードするように元の核酸から改変され、かつ第2のポリペプチドをコードする核酸が空隙をコードするように元の核酸から改変される、請求の範囲1項に記載の方法。

3. 工程(a)が、該第1のポリペプチドの境界部分由来の元の残基をコードする核酸が、該元の残基より大きい側鎖体積を有する導入残基をコードする核酸に置換される工程により行われる請求の範囲1項に記載の方法。

4. 導入残基がアルギニン(R)である請求の範囲3項に記載の方法。

5. 導入残基がフェニルアラニン(F)である請求の範囲3項に記載の方法。

6. 導入残基がチロシン(Y)である請求の範囲3項に記載の方法。

7. 導入残基がトリプトファン(W)である請求の範囲3項に記載の方法。

8. 工程(a)が、該第2のポリペプチドの境界部分由来の元の残基をコード

する核酸が、該元の残基より小さい側鎖体積を有する導入残基をコードする核酸に置換される工程により行われる請求の範囲1項に記載の方法。

9. 導入残基がシステイン(C)ではない請求の範囲8項に記載の方法。

10. 導入残基がアラニン(A)である請求の範囲8項に記載の方法。

11. 導入残基がセリン(S)である請求の範囲8項に記載の方法。

12. 導入残基がスレオニン(T)である請求の範囲8項に記載の方法。

- 13. 導入残基がバリリン（V）である請求の範囲8項に記載の方法。
- 14. 第1および第2のポリペプチドが、各々抗体の定常領域を含む請求の範囲1項に記載の方法。
- 15. 抗体の定常領域がC<sub>H</sub>3領域である請求の範囲14項に記載の方法。
- 16. 抗体の定常領域がI<sub>g</sub>G由来である請求の範囲15項に記載の方法。
- 17. I<sub>g</sub>GがヒトI<sub>g</sub>G<sub>1</sub>である請求の範囲16項に記載の方法。
- 18. 異種多量体が二重特異的抗体である請求の範囲1項に記載の方法。
- 19. 異種多量体が二重特異的イムノアドヘンシである請求の範囲1項に記載の方法。
- 20. 異種多量体が抗体-イムノアドヘンシキメラである請求の範囲1項に記載の方法。

- 21. 第1のポリペプチドの1個の元の残基が導入残基に置換される請求の範囲3項に記載の方法。
- 22. 第2のポリペプチドの1個の元の残基が導入残基に置換される請求の範囲8項に記載の方法。
- 23. 工程（a）が、第1及び第2のポリペプチドをコードする核酸が宿主細胞に導入される工程により行われる請求の範囲1項に記載の方法。
- 24. 請求の範囲1項に記載の方法により調製される異種多量体。
- 25. 境界部分において接触する第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含んでなり、第1のポリペプチドの境界部分は、第2のポリペプチドの境界部分の空隙内に配置されうる突起を有し、また、突起または空隙または両者が第1または第2のポリペプチドの境界部分にそれぞれ導入される異種多量体。
- 26. 突起及び空隙が、第1及び第2のポリペプチドの境界部分にそれぞれ導入される請求の範囲25項に記載の異種多量体。
- 27. 突起及び空隙が、各々天然アミノ酸残基を有してなる請求の範囲26項に記載の異種多量体。
- 28. 請求の範囲25項に記載の異種多量体及び医薬的に許容される担体を含んでなる組成物。

29. 請求の範囲25項に記載の異種多量体をコードする核酸を有してなる宿主細胞。

30. 第1のポリペプチドをコードする核酸及び第2のポリペプチドをコードする核酸が、単一ベクターに存在する請求の範囲29項に記載の宿主細胞。

31. 第1のポリペプチドをコードする核酸及び第2のポリペプチドをコードする核酸が、別個のベクターに存在する請求の範囲29項に記載の宿主細胞。

32. 請求の範囲29項に記載の宿主細胞を、核酸が発現されるべく培養し、細胞培養物から異種多量体を回収することを含む異種多量体の製造方法。

33. 宿主細胞が哺乳動物細胞である請求の範囲32項に記載の方法。

34. 異種多量体が細胞培養培地から回収される請求の範囲32項に記載の方法。

35. 異種多量体の調製に際し；

(a) 第1のポリペプチドをコードする第1の核酸を、該第1のポリペプチドの境界部分におけるアミノ酸残基を、より大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換し、これによって第1のポリペプチド上に突起を生成すべく改変し；

(b) 第2のポリペプチドをコードする第2の核酸を、該第2のポリペプチドの境界部分におけるアミノ酸残基を、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換し、これによって第1のポリペプチド上に空隙を生成し、ここにおいて該突起が該空隙内に配置可能であるようにすべく改変し；

(c) 宿主細胞に、該第1および第2の核酸を導入し、該第1および第2の核酸の発現が起こるように培養し；並びに

(d) 細胞培養物から形成された異種多量体を回収すること、  
を含んでなる異種多量体の製造方法。

36. 第1および第2のポリペプチドが、各々抗体の定常領域を含む請求の範囲35項に記載の方法。

37. 抗体の定常領域が $C_H3$ 領域である請求の範囲35項に記載の方法。

38. 抗体の定常領域がヒトIgG由来である請求の範囲15項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 異種多量体ポリペプチド類の製造方法

#### 発明の背景

#### 発明の分野

この発明は、多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、多重特異的イムノアドヘシン（例えば、二重特異的イムノアドヘシン）及び抗体－イムノアドヘシンキメラ等の異種多量体ポリペプチドの製造方法、並びに該方法を用いて製造される異種多量体ポリペプチド類に関するものである。

#### 関連技術の記述

##### 二重特異的抗体

少なくとも2種類の異なる抗原に対する結合特異性を有する二重特異的抗体（B s A b）は、インビトロ及びインビボにおける免疫診断及び治療用、並びに診断的免疫アッセイ用の標的試薬として、広範囲の臨床的応用における重要な可能性をもっている。

診断領域においては、二重特異的抗体は細胞表面分子の機能的特性を調査するため、並びに細胞毒性を媒介する異なったF c レセプタの能力を決定するために極めて有用であった（Fanger等、Crit. Rev. Immunol. 12:101-124[1992]）。Nolan等、Biochem. Biophys. Acta. 1040:1-11(1990)は、B s A bの別の診断的応用を記述している。特に、B s A bは、酵素免疫アッセイにおいて使用するための酵素を固定化するために固定化されうる。これを達成するために、B s A bの一方のアームを、結合が酵素の阻害を起こさないように酵素上の特定のエピトープに結合するように設計し、B s A bの他方のアームを所望の部位において高い酵素密度が保証されるように固定化担体に結合するよう設計されうる。そのような診断用B s A bは、Hammerling等、J. Exp. Med. 128:1461-1473(1968)に記述され、表面抗原の位置を決定するために使用されるウサギ抗-I g G／抗-フェリチンB s A bを含む。西洋ワサビパーオキシダーゼ（H R P）と共にホルモンに対し

て結合特異性を有するB s A bも開発されている。B s A bの他の可能性ある免疫化学的応用は、2部位免疫アッセイにおけるそれらの使用に関する。例えば、

分析対象蛋白質の2種の異なったエピトープに結合する2種類のB s A bが製造されており、一つのB s A bは、不溶化担体との複合体を結合し、他方は指示酵素を結合する（N o l a n等、上記文献）。

二重特異性抗体は、癌等の種々の疾患のインビトロまたはインビボ診断のためにも使用され得る（Songsivilai等、Clin. Exp. Immunol. 79:315[1990]）。該B s A bの診断的使用を容易にするために、B s A bの一方のアームは腫瘍関連抗原に結合し、他方のアームは放射性核種に強固の結合するキレート剤等の検出可能なマーカーと結合し得る。この方法を使用して、Le Doussal等は、ガン胎児性抗原（C E A）と結合する一方のアームと、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（D P T A）と結合する他方のアームとを有し、直腸及び甲状腺癌の放射免疫検出のために有用なB s A bを作成した。Le Doussal等、Int. J. Cancer Suppl. 7:58-62 (1992)及びLe Doussal等、J. Nucl. Med. 34:1662-1671(1993)参照。Stickney等は、同様に放射免疫検出を使用して、C E Aを発現する直腸癌検出方法を記述している。これらの研究者は、C E A並びにヒドロキシエチルチオウレアーベンジル-EDTA（E O T U B E）に結合するB s A bを記述している。Stickner等、Cancer Res. 51:6650-6655(1991)参照。

二重特異的抗体は、標的（例えば、病原または腫瘍細胞）に結合する一方のアーム、及びT-細胞レセプタまたはF c  $\gamma$ レセプタ等の細胞毒性トリガー分子結合する他方のアームを与えることによる再度向けられた細胞毒性において、ヒトの治療の為に使用され得る。したがって、二重特異的抗体は、患者の細胞免疫防御機構を腫瘍細胞または感染性物質に特異的に向けるために使用され得る。この戦略を使用して、F c  $\gamma$  R I I I（即ち、C D 1 6）に結合する二重特異的抗体が、インビトロにおいてナチュラルキラー（NK）細胞／大顆粒リンパ球（L G L）細胞による腫瘍細胞殺滅を媒介しうること、及びインビボにおいて腫瘍成長の阻害に有効であることが例示された。Segal等、Chem. Immunol. 47:179(1989)及びSegal等、Biologic Therapy of Cancer 2(4)DaVita等編、Lippincott、Philadelphia(1992) p 1 参照。同様に、F c  $\gamma$  R I I Iに結合する一方のアームとH E

R 2レセプタに結合する他方のアームとを有する二重特異的抗体が、H E R 2抗

原を過剰発現する卵巣及び乳癌の治療のために開発された。(Hseih-Ma等、Cancer Research 52:6832-6839[1992]及びWeiner等、Cancer Research 53:94-100[1993])。二重特異的抗体は、T細胞による殺滅をも媒介しうる。通常、二重特異的抗体は、T細胞上のCD3複合体を腫瘍関連抗原に結合させる。抗-p185<sup>HER2</sup>に結合する抗-CD3からなる完全にヒト化されたF(ab')<sub>2</sub>BsAbは、HER2レセプタを過剰発現する腫瘍細胞を殺滅するためにT細胞を標的とすべく使用された。Shalaby等、J. Exp. Med. 175(I):217(1992)。二重特異的抗体は、幾つかの早期第2相臨床試験において、希望がもてる結果を得て試験されている。一つの試験において、肺、卵巣または乳癌を有する12人の患者が、抗-CD3/抗-腫瘍(MOC31)二重特異的抗体二より標的とされる活性化T-リンパ球の輸液により治療された。deLeij等、Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger及びSegal編、Lienhart(1991)p249。標的細胞は、腫瘍細胞のかなりな局所的溶解、穏和な炎症性反応を誘発したが、毒性の副作用あるいは抗-マウス抗体応答を誘発することはなかった。B-細胞悪性腫瘍を有する患者における抗-CD3/抗-CD19二重特異的抗体による極めて予備的な試験において、末梢血腫瘍細胞含有量についてのかなりの低減も達成されている。Clark等、Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger及びSegal編、Lienhart(1991)p243。BsAbに関する治療適応については、Kroesen等、Cancer Immunol. Immunother. 37:400-407(1993)、Kroesen等、Br. J. Cancer 70:652-661(1994)及びWeiner等、J. Immunol. 152:2385(1994)も参照。

二重特異的抗体は、線維素溶解剤またはワクチンアジュバントとしても使用され得る。更にこれらの抗体は、感染症(例えば、HIVまたはインフルエンザウイルス等のウイルス性感染細胞に対する、またはトキソプラズマ・ゴンジ等の原生動物に対するエフェクター細胞を標的として)の治療において、またイムノトキシンを腫瘍細胞に届けるために、あるいは免疫複合体を細胞表面レセプタに向かわせるために使用され得る(Fanger等、前出文献)。

BsAbの使用は、十分な量及び純度をもってBsAbを得ることの困難性の



ために事実上困難に直面していた。伝統的には二重特異的抗体はハイブリッドマハイブリドーマ技術を使用して作成された (Millstein及びCuello、Nature 305: 537-539[1983])。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の無作為な組み合わせのために、これらのハイブリドーマ (クオドローマ) は、10種の異なる抗体分子の可能性ある混合物を製造し、それらのうちわずか1種のみが適切な二重特異的構造を有する (添付の図1参照)。通常はアフィニティクロマトグラフィーにより行われる適切な分子の精製は、かなり煩雑であって、生成物の収率は低い。従って、より高収率のBsAbの製造技術が開発されてきた。これらはここに添付の図2A-2Eに記述される。図2Aに示されるように、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。抗体断片の化学結合を達成するために、Brennan等、Science 229:81(1985)は、完全な抗体を蛋白分解的に切断してF(ab')断片を精製する方法を記述している。これらの断片は、隣接炭素のジチオールを安定化し、分子内ジスルフィド形成を阻害するためにジチオール複合体形成試薬亜ヒ酸ナトリウム存在下で還元される。生成されたF(ab')断片は、次いでチオニトロベンゾエート (TNB) 誘導体に変換される。次いでF(ab')-TNB誘導体は、メルカプトエチルアミンを用いる還元によりF(ab')-チオールに再変換され、等モル量の他のF(ab')-TNB誘導体と混合されてBsAbを形成する。精製されるBsAbは、酵素の選択的固定化のための試薬として使用され得る。

最近の発展は、化学的に結合し得て二重特異的抗体を形成するF(ab')-SH断片をE. coliから直接回収することを容易にした (図2B参照)。Shalaby等、J. Exp. Med. 175:217-225(1992)は、p185<sup>HER2</sup>に結合する一方のアーム及びCD3に結合する他方のアームを有する完全ヒト化BsAb F(ab')<sub>2</sub>の製造を記述している。各F(ab')断片は、E. coliから別個に分泌され、インピットロにおける直接的な化学的カップリングに付されてBsAbが形成される。斯くして形成されるBsAbは、HER2レセプタを過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合し得、また、ヒト乳癌標的に対するヒト細胞毒性リンパ細胞の溶菌活性をトリガーする。Rodrigues等、Int. J. Cancers (Suppl.) 7:45-50(1992)も参照。

述されている。例えば、二重特異的F (a b')<sub>2</sub>異種二量体が、ロイシンジッパーを使用して製造されている(図2 C参照)。Kostelny等、*J. Immunol.* 148(5):1547-1553(1992)。F o s 及びJ u n 蛋白質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって抗-CD 3 及び抗-インターロイキン-2 (I L-2 R) 抗体のF a b' 部分に連結される。該抗体同種二量体は、ヒンジ領域において還元されて単量体を形成し、次いで再酸化されて抗体異種二量体を形成する。該B s A b は、インビトロにおいてH u T-1 0 2 細胞を溶解するために細胞毒性T 細胞の補充において高度に有効であることが見いだされた。Hollinger等、*PNAS(USA)* 90:6444-6448(1993)により記述される“ジアボディ (diabody)” 技術の出現は、B s A b 断片製造の別の技術を提供した。該断片は、同じ鎖上の2つの領域間で対形成を許容するには短すぎるリンカーによって軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)に連結する重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含んでなる。従って、一つの断片のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域は、他の断片の相補的なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域と対形成することを強いられ、これによって、2個の抗原結合部位を形成する(これに添付の図2 D参照)。単一鎖F<sub>v</sub> (s F<sub>v</sub>) 二量体を使用することによるB s A b 製造のための他の方策も報告されている。Gruber等、*J. Immunol.* 152:5368(1994)参照。これらの研究者等は、抗-フルオレセイン抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域に対して25アミノ酸リンカーにより結合する、T細胞レセプタに対して向けられた抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を含んでなる抗体を設計した。再度折り畳まれた分子(ここに添付の図2 E参照)は、フルオレセイン及びT細胞レセプタに結合し、表面に共有的に結合されたフルオレセインを有するヒト腫瘍細胞の溶解に再度向けられた。

組換え細胞培養物から直接回収されうる二重特異的抗体断片の製造のための幾つかの技術が報告されていることは見たとおりである。しかしながら、完全長B s A b が、それらの予想されるより長い半減期及び可能性あるエフェクター機能故に、多くの臨床的応用のためのB s A b 断片として好ましいであろう。

#### イムノアドヘシン

イムノアドヘシン類(I a)は、細胞表面レセプタまたはリガンド等の蛋白質

機能とを組み合わせた抗体様分子である。イムノアドヘシンは、ヒト抗体の多くの有用な化学的及び生物学的性質を有している。イムノアドヘシンは、適切なイムノグロブリンヒンジ及び定常領域（Fc）配列に結合される所望の特異性を持ったヒト蛋白質配列から構築され得るため、興味ある結合特異性は、完全にヒト成分を使用して達成されうる。この様なイムノアドヘシン類は、患者に対して最小の免疫原性であり、継続的または反復的使用について安全である。

文献中に報告されているイムノアドヘシン類は、T細胞レセプタ（Gascoigne等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940[1987]）；CD4（Capon等、Nature 337:525-531[1989]；Trautenecker等、Nature 339:68-70[1989]；Zettmeissl等、Dev. Cell Biol. USA 9:347-353[1990]）；及びByrn等、Nature 344:667-670[1990]）；L-セレクトリンまたは帰巢レセプタ（Watson等、J. Cell. Biol. 110:2221-2229[1990]）；及びWatson等、Nature 349:164-167[1991]）；CD44（Aruffo等、Cell 61:1303-1313[1990]）；CD28及びB7（Linsley等、J. Exp. Med. 173:721-730[1991]）；CTLA-4（Linsley等、J. Exp. Med. 174:561-569[1991]）；CD22（Stamenkovic等、Cell 66:1133-1144[1991]）；TNFレセプタ（Ashkenazi等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539[1991]；Lesslauer等、Eur. J. Immunol. 27:2883-2886[1991]）；及びPeppl等、J. Exp. Med. 174:1483-1489[1991]）；NPレセプタ（Bennett等、J. Biol. Chem. 266:23060-23067[1991]）；インターフェロングレセプタ（Kurschner等、J. Biol. Chem. 267:9354-9360[1992]）；4-1BB（Chalupny等、PNAS[USA] 89:10360-10364[1992]）並びにIgEレセプタ $\alpha$ （Ridgway及びGorman、J. Cell. Biol. 115巻、要約番号1448[1991]）の融合物を含む。

治療的使用に関して記述されているイムノアドヘシンの例は、HIVの細胞表面CD4に対する結合を阻害するためのCD4-IgGイムノアドヘシンを含む。CD4-IgGが出産直前の妊婦に対して投与された臨床試験の第I相から得られたデータは、このイムノアドヘシンがHIVの母胎-胎児転移の阻害に有用であろうことを示唆している。Ashkenazi等、Intern. Rev. Immunol. 10:219-227(1

993)。腫瘍壊死因子（TNF）に結合するイムノアドヘシンも開発されている。TNFは敗血性ショックの主要な媒介因子であることが示されている前炎症性サイトカインである。敗血性ショックのマウスモデルに基づいて、TNFレセプタイ

ムノアドヘシンは、敗血性ショックの治療における臨床的使用の候補として有望であることを示した（Ashkenazi等、前出文献）。イムノアドヘシンは、非治療的用途も有する。例えば、L-セレクトインレセプタイムノアドヘシンは、末梢リンパ節の高内皮小静脈（HEV）の組織化学的染色のための試薬として使用された。この試薬は、L-セレクトインリガンドの単離及び性質決定の為に使用された（Ashkenazi等、前出文献）。

イムノアドヘシン構造の2つのアームが、異なる特異性を有する場合には、イムノアドヘシンは二重特異的抗体との類似において“二重特異的イムノアドヘシン”と称される。Dietsch等、*J. Immunol. Methods* 162:123(1993)は、粘着分子の細胞外領域、E-セレクトイン及びP-セレクトインを結合するような二重特異的イムノアドヘシンを記述している。結合研究は、形成された二重特異的イムノグロブリン融合蛋白質が、それから誘導される単一特異的イムノアドヘシンに比べて骨髓細胞系に結合する向上した能力を有することを示した。

#### 抗体-イムノアドヘシンキメラ類

抗体-イムノアドヘシン（Ab/Ig）キメラ類も、文献中に記述されている。これらの分子は、イムノアドヘシンの結合領域と抗体の結合領域とを組み合わせている。

Berg等、*PNAS (USA)* 88:4723-4727(1991)は、ネズミCD4-IgGから誘導された二重特異的抗体-イムノアドヘシンキメラを作成した。これらの研究は、2つのアームを有する4量体分子を構築した。一方のアームは、抗体軽鎖定常領域とのCD4融合と共に、抗体重鎖定常領域とのCD4融合からなる。他方のアームは、同じ抗体の完全軽鎖と共に、抗-CD3抗体の完全重鎖からなる。CD4-IgGアームによって、この二重特異的分子は、細胞毒性T細胞表面のCD3に結合する。細胞毒性細胞とHIV-感染細胞との並置は、後者の細胞の特異的

殺滅を生じる。

B e r g 等は構造的に 4 量体であった二重特異的分子を記述しているが、1 個のみの C D 4 - I g G 融合を含む 3 量体融合分子を製造することも可能である。Chamow 等、J. Immunol. 153:4268(1994) 参照。この構造の第 1 のアームは、ヒト化

抗-C D 3  $\kappa$  軽鎖及びヒト化 C D 3  $\gamma$  重鎖から形成される。第 2 のアームは、g p 1 2 0 結合に関わる C D 4 の細胞外領域部分と I g G の F c 領域との組合せである C D 4 - I g G イムノアドヘシンである。得られた A b / I a キメラは、純粋な細胞毒性 T 細胞調製物、または F c レセプタを持つ大顆粒リンパ球エフェクター細胞を付加的に含む全末梢血リンパ球 (P B L) のいずれかを使用して、H I V - 感染細胞の殺滅を媒介した。

上述の異種多量体の製造において、所望の異種多量体の同種多量体を上回る収率の向上が望まれる。ここに記述する発明は、これを達成する手段を提供する。

#### 発明の要約

この出願は、異種オリゴマー形成の為の第 1 および第 2 のポリペプチド間の境界部分の操作に供せられる“空隙への突起(protuberance-into-cavity)”戦略を記述する。採用される戦略の模式的例示については図 4 を参照されたい。好ましい境界部分は、抗体定常領域の C<sub>H</sub> 3 領域の一部を少なくとも含んでなる。“突起”は、第 1 のポリペプチドの境界部分からの小さいアミノ酸側鎖を、大きい側鎖 (例えば、チロシンまたはトリプトファン) に置換することにより構築される。該突起と同等かまたは似た大きさの補償的“空隙”は、場合により第 2 のポリペプチドの境界部分に、大きいアミノ酸側鎖を小さいもの (例えば、アラニンまたはスレオニン) に置換することによって創製される。適切に配置され寸法が決められた突起または空隙が、第 1 または第 2 のポリペプチドのいずれかの境界部分に存在する場合には、対応する空隙または突起のそれぞれを隣接する境界部分に作成するのみでよい。

従って、本発明は境界部分において接触する第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドを含んでなり、第 1 のポリペプチドは第 2 のポリペプチドの境界部

分の空隙に位置させることができる突起をその境界部分に有する異種多量体の調製方法に関するものであるといえる。一側面において、該方法は、(a) 第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドをコードする核酸を有し、第1のポリペプチドをコードする該核酸が突起をコードするように元の核酸から改変されるか、または第2のポリペプチドをコードする核酸が空隙をコードするように元の核酸

から改変され、あるいはその両者である宿主細胞を、該核酸が発現されるべく培養し；及び(b) 宿主細胞培養物から該異種多量体を回収することを含む。

通常は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両者をコードする核酸が、突起及び空隙をそれぞれコードするように改変される。好ましくは、第1および第2のポリペプチドの各々は、ヒト IgG<sub>1</sub>のC<sub>H</sub>3領域等の抗体定常領域を含む。

本発明は、境界部分で接触する第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを含んでなる異種多量体（二重特異的抗体、二重特異的イムノアドヘシンまたは抗体／イムノアドヘシンキメラ等）をも提供するものである。第1のポリペプチドの境界部分は、第2のポリペプチドの境界部分の空隙内に配置されうる突起を有し、また、突起または空隙または両者が第1または第2のポリペプチドの境界部分にそれぞれ導入される。異種多量体は、更に医薬的に許容される担体を含む組成物の形態で提供されてもよい。

本発明は、前節の異種多量体をコードする核酸を有し、該第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドをコードする核酸が、単一のベクターまたは別個のベクターに存在する宿主細胞にも関するものである。該宿主細胞は、宿主細胞を該核酸が発現されるべく培養し、該細胞培養物から該異種多量体を回収することを含んでなる異種多量体の製造方法において使用され得る。

更なる側面において、本発明は、

(a) 第1のポリペプチドをコードする第1の核酸を、該第1のポリペプチドの境界部分におけるアミノ酸残基を、より大きい側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換し、これによって第1のポリペプチド上に突起を生成すべく改変し；

(b) 第2のポリペプチドをコードする第2の核酸を、該第2のポリペプチドの境界部分におけるアミノ酸残基を、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基に置換し、これによって第1のポリペプチド上に空隙を生成し、ここにおいて該突起が該空隙内に配置可能であるようにすべく改変し；

(c) 宿主細胞に、該第1および第2の核酸を導入し、該第1および第2の核酸の発現が起こるように培養し；並びに

(d) 細胞培養物から形成された異種多量体を回収すること、

を含んでなる異種多量体の製造方法を提供する。

本発明は、同種多量体等の他の望ましからぬ最終生成物を上回って異種多量体の収率を上昇させる機構を提供する。好ましくは、組換え細胞培養物から回収される異種多量体の収率は、副生成物同種多量体に対比して少なくとも80%より多く、好ましくは90%より多い。

#### 図面の簡単な記述

図1は、Millstein及びCuelloの前出文献の伝統的融合ーハイブリドーマ技術が全長BsAbの製造に使用された場合に創製されうる種々の抗体分子を示す。

図2Aー2Eは、上記背景の節で検討したBsAb断片製造についての背景の種々の技術を例示する。

図3Aー3Cは、レセプタの結合領域(図3A)及びIgG<sub>1</sub>イムノグロブリンの定常領域(図3B)を有してなるイムノアドヘシン二量体(図3C)の製造のための例示的方策を示している。

図4は、異種多量体創製のための本出願の空隙への突起(protuberance-into-cavity)戦略を模式的に例示する。

図5は、イムノグロブリンIgG(配列番号:1ー3)、IgA(配列番号:4)、IgD(配列番号:5)、IgE(配列番号:6)及びIgM(配列番号:7)のC<sub>H</sub>3領域の境界部分残基を示す。これらのイムノグロブリンの各C<sub>H</sub>3領域は、2つの異なる平行した“β-シート”を有してなる“β-サンドイッチ”を作る。β-シート的一方は、境界部分残基を提供し、他方は、“外部β-シート”である。境界部分を形成する該β-シートは、4つの“β-鎖”から形成

される。種々のイムノグロブリンのC<sub>H</sub>3領域の7つのβ-鎖の各残基は、ダッシュの上線により同一性を示してある。境界部分の中間及び端部のβ-鎖の残基は、外部β-シートのものと同様に同定されている。残基の番号付けは、Fc結晶構造に従っている(Deisenhofer、BioChem. 20:2361[1981])。C<sub>H</sub>3領域の境界部分内部に埋もれた残基は“B”により特定され、C<sub>H</sub>3領域の境界部分内部に部分的に埋もれたものは“b”により特定され、境界部分に部分的に埋もれる(即ち26%—10%露出する)“接触”残基は“i”により特定され、並びに境界部

分に埋もれる(即ち<6%露出する)残基は“I”により特定される。太字の残基は、外来残基により置換されるべき最適の候補である元々の残基である。

図6は、ヒト(h)(配列番号:8—11および16)またはネズミ(m)(配列番号:12—15)のIgGサブタイプの境界部分残基を特定する(B=A S X及びZ=G L X)。境界部分の端部及び中間部のβ-鎖の残基は、括弧が付され、また“定常”残基は矢印により示される。配列は、Miller等、J. Mol. Biol. 216:965(1990)及びKabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5版(1991)。定常残基が高度の保存されていることが明らかである。

図7は、ヒトIgG<sub>1</sub>のC<sub>H</sub>3領域の境界部分残基を表す。データは、Miller等、J. Mol. Biol. 216:965(1990)から導かれた。“接触”残基が示され、またここに記述される実施例において変異を受けた残基は枠が付されている。

図8は、実施例に記述されるFc異種2量体化を試験するための共-トランスフェクションアッセイを模式的に示す。

図9は、残基Phe<sup>405</sup>及びThr<sup>394</sup>と共に、境界部分の反対側のT366Y及びY407T変異に強調を付したヒトIgG<sub>1</sub>Fcの2.9オングストローム構造に基づくC<sub>H</sub>3の2量体を示す(“Kabat番号”—Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5版[1991])。

図10A—10Eは、イムノアドヘシン(Ia)を伴う抗体(Ab)重鎖(H



）及び軽鎖（L）の共トランスフェクションからの生成物のSDS-PAGEの走査密度測定的分析を示す。図10Aは天然型を示し；図10Bは変異体Ab Y407T, I a T 366Yを示し；図10Cは変異体Ab T366Y, I a Y407Tを示し；図10Dは変異体Ab F405A, I a T394Wを示し；図10Eは変異体Ab T366Y:F405A, a T394W:Y407Tを示す。示されるデータは、少なくとも2回の独立した実験からの平均値である。密度測定的信号応答は、密接に関連するヒト化抗体、h u M A b 4 D 5-8（Carter等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285[1992]）を使用した対照実験により判断されるように、使用した実験範囲（0.02-10  $\mu$ g）に亘って線形であること

が見い出された（R=0.9993）。

#### 1. 定義

一般的には、下記の用語及び句は、この記述、実施例及び請求の範囲において使用される場合に下記の定義を有する：

“異種多量体”または“異種多量体性ポリペプチド”は、少なくとも第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドを有し、ここにおいて第2のポリペプチドはアミノ酸配列において第1のポリペプチドとは少なくとも1個のアミノ酸残基が異なる分子である。好ましくは、該異種多量体は、少なくとも2種の異なるリガンドまたは結合部位に対して結合特異性を有する。該異種多量体は、第1および第2のポリペプチドにより形成される“異種2量体”を含むことができ、あるいは第1および第2のポリペプチドに加えてポリペプチドが存在する、より高次の3次構造を形成しうる。異種多量体の例示的構造は、異種2量体（例えば、Dietrich等の前出文献に記述される二重特異的イムノアドヘシン）、異種3量体（例えば、Chamow等の前出文献に記述されるAb/I a キメラ）、異種4量体（例えば、二重特異的抗体）及び更なるオリゴマー構造を含む。

ここにおいて使用されるように、“ポリペプチド”は、一般に約10個以上のアミノ酸を有するペプチド及び蛋白質を指す。好ましくは、哺乳動物ポリペプチド（哺乳動物有機体から元々誘導されたポリペプチド）が使用され、更に好まし

くは、直接培地中に分泌されたものである。細菌性ポリペプチドの例は、アルカリホスファターゼ及び $\beta$ -ラクタマーゼを含む。哺乳動物ポリペプチドの例は、レニン、ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボ蛋白質；アルファ-1-アンチトリプシン；インシュリンA-鎖；インシュリンB-鎖；プロインシュリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第VIII C因子、第IX因子、組織因子、及びフォンビルブラント因子等の凝血因子；蛋白質C等の抗凝血因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺界面活性物質；ヒト尿のウロキナーゼまたは組織型プラスミノゲン活性化因子（t-PA）等のプラスミノゲン活性化因子；ボンベシン；トロロンビン；造血性成長因子；腫瘍壊死

因子- $\alpha$ 及び $\beta$ ；エンケファリナーゼ；RANTES（活性化時に調節され通常T-細胞に発現分泌される物質）、ヒトマクロファージ炎症性蛋白質（MIP-1-アルファ）；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ム-レリアン-阻害物質；レラキシンA-鎖；レラキシンB-鎖；プロレラキシン；マウスゴナドトロピン-関連ペプチド；ベーターラクタマーゼ等の微生物蛋白質；DNase；インヒビン；アクチビン；血管上皮成長因子（VEGF）；ホルモンまたは成長因子に対するレセプタ類；蛋白質AまたはD；リウマチ性因子；骨-誘導神経栄養性因子（BDNF）、ニューロトロフィン-3、-4、-5もしくは-6（NT-3、NT-4、NT-5、もしくはNT-6）、またはNGF- $\beta$ 等の神経成長因子等の神経栄養性因子；血小板-誘導成長因子（PDGF）；aFGF及びbFGF等の線維芽細胞成長因子；表皮成長因子（EGF）；TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4、またはTGF- $\beta$ 5を含むTGF-アルファ及びTGF-ベータ等のトランスフォーミング成長因子（TGF）；インシュリン様成長因子-I及び-II（IGF-I及びIGF-II）；デス（1-3）-IGF-I（脳IGF-I）、インシュリン様成長因子結合蛋白質；CD-3、CD-4、CD-8及びCD-19等のCD蛋白質；エリスロポイエチン；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形態形成蛋白質（BMP）；インターフ

ェロン-アルファ、-ベータ及び-ガンマ等のインターフェロン；例えばM-CSF、GM-CSF及びG-CSF等のコロニー刺激因子（CSF類）；例えばIL-1～IL-10等のインターロイキン類（IL）；スーパーオキシドジスムターゼ；T-細胞レセプタ類；表面膜蛋白質；崩壊加速因子；例えば、AIDSエンベロープ部分等のウイルス性抗原；輸送蛋白質；帰巢レセプタ；アドレシン；調節蛋白質；抗体類；並びに上記に掲げたポリペプチド類のいずれかの断片を含む。

“第1のポリペプチド”は、第2のポリペプチドと連携すべき任意のポリペプチドである。第1および第2のポリペプチドは、“境界部分”（下記に定義される）において接触する。境界部分に加えて、第1のポリペプチドは、“結合領域”（例えば、抗体可変領域、レセプタ結合領域、リガンド結合領域または酵素活性領域）またはC<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>1およびC<sub>L</sub>領域を含む抗体定常領域（またはその一部）

等の、1個以上の付加的な領域を含んでもよい。通常は、第1のポリペプチドは、抗体から誘導される少なくとも1個の領域を含むであろう。この領域は都合よくは、抗体のC<sub>H</sub>3領域等の定常領域であり、第1のポリペプチドの境界部分を形成しうる。例示的な第1のポリペプチドは、抗体重鎖ポリペプチド、抗体定常領域と異種のポリペプチドの結合領域とが結合するキメラ（即ち、イムノアドヘシン、下記の定義参照）、レセプタポリペプチド（特に、例えばインターロイキン-8レセプタ [IL-8R] 及びインテグリン異種2量体 [例えば、LFA-1またはGP11b/11a] 等の他のレセプタポリペプチドと2量体を形成するもの）、リガンドポリペプチド（例えば、神経成長因子 [NGF]、ニューロトロフィン-3 [NT-3]、及び脳-誘導神経栄養因子 [BDNF] -Arakawa等、J. Biol. Chem. 269(45):27833-27839[1994]及びRadziejewski等、Biochem. 32(48):1350[1993]）、並びに抗体可変領域ポリペプチド（例えば、ジアボディ類）を含む。好ましい第1のポリペプチドは、抗体重鎖及びイムノアドヘシンから選択される。

“第2のポリペプチド”は、第1のポリペプチドと“境界部分”を介して連携

する任意のポリペプチドである。境界部分に加えて、第2のポリペプチドは、“結合領域”（例えば、抗体可変領域、レセプタ結合領域、リガンド結合領域または酵素活性領域）またはC<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>1およびC<sub>L</sub>領域を含む抗体定常領域（またはその一部）等の、1個以上の付加的な領域を含んでもよい。通常は、第2のポリペプチドは、抗体から誘導される少なくとも1個の領域を含むであろう。この領域は都合よくは、抗体のC<sub>H</sub>3領域等の定常領域であり、第2のポリペプチドの境界部分を形成しうる。例示的な第2のポリペプチドは、抗体重鎖ポリペプチド、抗体定常領域と異種的なポリペプチドの結合領域とが結合するキメラ（即ち、イムノアドヘシン、下記の定義参照）、レセプタポリペプチド（特に、例えばインターロイキン-8レセプタ [IL-8R] 及びインテグリン異種2量体 [例えば、LFA-1またはGP11b/IIb] 等の他のレセプタポリペプチドと2量体を形成するもの）、リガンドポリペプチド（例えば、神経成長因子 [NGF]、ニューロトロフィン-3 [NT-3]、及び脳-誘導神経栄養因子 [BDNF] -Arakawa等、J. Biol. Chem. 269(45):27833-27839[1994]及びRadziejewski等、

Biochem. 32(48):1350[1993])、並びに抗体可変領域ポリペプチド（例えば、ジアボディ類）を含む。好ましい第2のポリペプチドは、抗体重鎖及びイムノアドヘシンから選択される。

“結合領域”は、興味ある分子（例えば、抗原、リガンド、レセプタ、基質または阻害剤）に対する選択的結合を担うポリペプチドのいずれかの領域を含む。例示的な結合領域は、抗体可変領域、レセプタ結合領域、リガンド結合領域、及び酵素活性領域を含む。

“抗体”なる用語は、興味ある抗原上のエピトープに結合可能な1個以上の領域を含み、この様な領域が抗体の可変領域から誘導されるか、あるいは相同的であるポリペプチドを意味するであろう。抗体類の例は、完全長抗体、抗体断片、単鎖分子、二重特異的または二重機能的分子、ジアボディ類、及びキメラ抗体（例えば、ヒト化または霊長類化 [Primatized<sup>TM</sup>] 抗体）を含む。“抗体断片”は、Fv、Fv'、Fab、Fab' 及びF(ab')<sub>2</sub>断片を含む。

非ヒト（例えば、齧歯類または霊長類）抗体の“ヒト化”形態は、非ヒトイムノグロブリンから誘導される最小の配列を含む特定のキメライムノグロブリン、イムノグロブリン鎖またはその断片である。殆どの部分について、ヒト化抗体は、受容者の相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性及び容量を有するマウス、ラット、ウサギまたは霊長類等の非ヒト分子種（提供者抗体）のCDRに由来する残基に置換されたヒトイムノグロブリン（受容者抗体）である。ある例においては、ヒトイムノグロブリンのFVフレームワーク領域（FR）の残基が、対応する非ヒト残基に置換されている。更に、ヒト化抗体は、受容者抗体及び導入したCDR若しくはフレームワーク配列のいずれにも見出し出されない残基を有していてもよい。これらの修飾は、抗体の性能を更に改善し至適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1個、または典型的には2個の変換領域の実質的に全てを含み、ここにおいてCDR領域の実質的に全ては、非ヒトイムノグロブリンのそれらに対応し、またFR領域の全てまたは実質的に全てがヒトイムノグロブリンのそれらである。ヒト化抗体は、至適には、イムノグロブリンの定常領域（Fc）、典型的にはヒトイムノグロブリンのものの少なくとも一部を有するであろう。ヒト化抗体は、霊長類化（Primatized™）抗

体を含み、ここにおいて抗体の抗原結合領域は、興味ある抗原により免疫されたマカクザルにより産生された抗体から誘導される。

“多重特異的抗体”は、少なくとも種類の異なる抗原に対して結合特異性を有する分子である。通常はこの様な分子は2個の抗原に結合するのみであろうが（即ち、二重特異的抗体、BsAb）、ここにおいて使用される場合に三重特異的抗体等の更なる特異性を持った抗体もこの表現に包含される。BsAbの例は、一方のアームが腫瘍細胞抗原に向けられ、他方のアームが抗-FcγRI/抗-CD15、抗-p185<sup>HER2</sup>/FcγRIII（CD16）、抗-CD3/抗-悪性B細胞（1D10）、抗-CD3/抗-p185<sup>HER2</sup>、抗-CD3/抗-p97、抗-CD3/抗-腎臓細胞悪性腫瘍、抗-CD3/抗-OVCAR-3、抗-CD3/L-D1（抗-結腸癌）、抗-CD3/抗-メラニン細胞刺激ホル

モン類似体、抗-EGFレセプタ／抗-CD3、抗-CD3／抗-CAMA1、抗-CD3／抗-CD19、抗-CD3／MoV18、抗-神経細胞粘着分子（NCAM）／抗-CD3、抗-葉酸結合蛋白質（FBP）／抗-CD3、抗-顔面悪性腫瘍関連抗原（AMOC-31）／抗-CD3等の細胞毒性トリガー分子に対して向けられたもの；腫瘍抗原に特異的に結合する一方のアームと、抗-サポリン／抗-Id-1、抗-CD22／抗-サポリン、抗-CD7／抗-サポリン、抗-CD38／抗-サポリン、抗-CEA／抗-リシンA鎖、抗-インターフェロン- $\alpha$ （IFN- $\alpha$ ）／抗-ハイブリドマイディオタイプ、抗-CEA／抗-ピンカアルカロイド等に結合するもう一方のアームを有するBsAb；抗-CD30／抗-アルカリホスファターゼ（マイトマイシンリン酸塩プロドラッグのマイトマイシンアルコールへの変換を触媒する）等の、酵素活性化プロドラッグの変換のためのBsAb；抗-フィブリン／抗-組織プラスミノゲン活性化因子（tpA）、抗-フィブリン／抗-ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（uPA）等の線維素溶解剤として使用され得るBsAb；抗-低密度リポ蛋白質（LDL）／抗-Fcレセプタ（例えば、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIまたはFc $\gamma$ RIII）等の細胞表面レセプタに対する免疫複合体を標的とするBsAb；抗-CD3／抗-単純ヘルペスウイルス（HSV）、抗-T細胞レセプタ：CD3複合体／抗-インフルエンザ、抗-Fc $\gamma$ R／抗-HIV等の感

染症治療に使用するためのBsAb；抗-CEA／抗-EOTUBE、抗-CEA／抗-DPTA、抗-p185<sup>IHER2</sup>／抗-ハプテン等のインビトロまたはインビボにおける腫瘍検出のためのBsAb；ワクチンアジュバントとしてのBsAb（Fanger等、前出文献参照）；並びに抗-ウサギIgG／抗-フェリチン、抗-西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）／抗-ホルモン、抗-ソマトスタチン／抗-物質P、抗-HRP／抗-FITC、抗-CEA／抗- $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の診断道具としてのBsAb（Nolan等、前出文献参照）等を含む。三重特異的抗体の例は、抗-CD3／抗-CD4／抗-CD37、抗-CD3／抗-CD5／抗-CD37及び抗-CD3／抗-CD8／抗-CD37を含む。

ここにおいて使用されるように、“イムノアドヘンシ”なる用語は、異種蛋白

質（例えば、レセプタ、リガンドまたは酵素等の“アドヘシン”）の“結合領域”と、イムノグロブリンの定常領域のエフェクター機能とを組み合わせた抗体様分子を指す。構造的にはイムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位（抗原結合部位）以外の（即ち、異種的な）所望の結合特異性を有するアドヘシンのアミノ酸配列と、イムノグロブリン定常領域配列との融合を有してなる。イムノアドヘシンのイムノグロブリン定常領域配列は、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、若しくはIgG<sub>4</sub>サブタイプ、IgA、IgE、IgDまたはIgM等の任意のイムノグロブリンから得ることができる。

ここにおいて使用されるように“リガンド結合領域”なる用語は、任意の天然細胞表面レセプタ、または少なくとも定性的なリガンド結合能力、好ましくは対応する天然レセプタの生物学的活性を維持するその任意の領域若しくは誘導体を指す。特定の実施態様において、レセプタは、イムノグロブリン超遺伝子ファミリーの一員に相同的である細胞外領域を有する細胞表面ポリペプチド由来である。イムノグロブリン超遺伝子ファミリーの一員ではないが、それにも関わらずこの定義に特定の包含される他の典型的なレセプタ類は、サイトカインレセプタ類、特にチロシンキナーゼ活性を有するレセプタ類（チロシンキナーゼレセプタ）、造血因子及び神経成長因子レセプタ超ファミリーの一員、並びに細胞粘着分子、例えば（E-、L-及びP-）セ렉チンである。

“レセプタ結合領域”なる用語は、細胞粘着分子を含む、レセプタに対する任

意の天然リガンド、または少なくとも定性的なレセプタ結合能力、好ましくは対応する天然リガンドの生物学的活性を維持するその任意の領域若しくは誘導体を指す。この定義は、他のものの間にあつて特には上記レセプタに対するリガンドに由来する結合配列を含む。

ここにおいて使用されるように“多重特異的イムノアドヘシン”なる句は、少なくとも2種の結合特異性（即ち、2種以上のアドヘシン結合領域）を有するイムノアドヘシン（上記に定義）を示す。多重特異的イムノアドヘシンは、基本的にWO 89/02922（1989年4月6日発行）、EP 314,317（1989年5月3日発行）及び1992年5月2日発行の米国特許第5,116,

964号に開示されているように異種2量体、異種3量体または異種4量体として組み立てられ得る。好ましい多重特異的イムノアドヘシンは、二重特異的である。二重特異的イムノアドヘシンの例は、CD4-IgG/TNFレセプターIgG及びCD4-IgG/L-セレクトイン-IgGを含む。最後に述べた分子は、リンパ細胞帰巢レセプタ（LHR、L-セレクトイン）のリンパ節結合機能を、CD4のHIV結合機能と組み合わせたもので、HIV感染または関連症状の予防または治療、または診断薬としての有望な応用が見いだされる。

“抗体-イムノアドヘシンキメラ（Ab/Iaキメラ）”は、抗体（ここの定義される）の少なくとも1個の結合領域と、少なくとも1個のイムノアドヘシン（本願に定義される）とを組み合わせた分子を指す。例示的Ab/Iaキメラは、Berg等の前出文献及びChamow等の前出文献に記述される二重特異的CD4-IgGキメラである。

“境界部分”は、第2のポリペプチドの境界部分の1個以上の“接触”アミノ酸残基（または他の非アミノ酸基）と相互作用する第1のポリペプチドの“接触”アミノ酸残基（または炭化水素基、NADH、ビオチン、FAD若しくはヘム基等の他の非アミノ酸基）を含む。好ましい境界部分は、可変領域または定常領域等のイムノグロブリンの領域（またはその一部）であるが、異種多量体レセプタを形成するポリペプチド間の境界部分、またはNGF、NT-3及びBDNF等の2種以上のリガンドの間の境界部分は、この用語の範囲内に含まれる。好ましい境界部分は、好ましくはIgG抗体から、最も好ましくはヒトIgG<sub>1</sub>抗

体から誘導されるイムノグロブリンのC<sub>H</sub>3領域を含む。

“突起”は、第1のポリペプチドの境界部分から突出する少なくとも1個のアミノ酸側鎖を指し、如かして異種多量体を安定化するように隣接する境界部分（即ち、第2のポリペプチドの境界部分）の補償的空隙内に配置可能であって、これによって例えば、好ましい異種多量体の形成が同種多量体の形成を上回るようになる。突起は、元々の境界部分に存在してもよく、あるいは合成的に（例えば、境界部分をコードする核酸の変更により）導入されてもよい。通常は、第1の



ポリペプチドの境界部分をコードする核酸が、突起をコードするように変更される。これを達成するために、第1のポリペプチドの境界部分内の少なくとも1個の“元々の”アミノ酸残基をコードする核酸が、該元々のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有する少なくとも1個の“導入”アミノ酸残基をコードする核酸に置換される。1個より多い元々の及び対応する導入残基があり得ることは認識されるであろう。置換される元々の残基数の上限は、第1のポリペプチドの境界部分の全残基数である。種々のアミノ残基の側鎖体積は下記の表に示されている。

表 1

## アミノ酸側鎖の性質

アミノ酸	1 文字 略号	質量 <sup>a</sup> (ドルトン)	体積 <sup>b</sup> ( $\text{\AA}^3$ )	接近表面積 <sup>c</sup> ( $\text{\AA}^2$ )
アラニン (Ala)	A	71.08	88.6	115
アルギニン (Arg)	R	156.20	173.4	225
アスパラギン (Asn)	N	114.11	117.7	160
アスパラギン酸 (Asp)	D	115.09	111.1	150
システイン (Cys)	C	103.14	108.5	135
グルタミン (Gln)	Q	128.14	143.9	180
グルタミン酸 (Glu)	E	129.12	138.4	190
グリシン (Gly)	G	57.06	60.1	75
ヒスチジン (His)	H	137.15	153.2	195
イソロイシン (Ile)	I	113.17	166.7	175
ロイシン (Leu)	L	113.17	166.7	170
リジン (Lys)	K	128.18	168.6	200
メチオニン (Met)	M	131.21	162.9	185
フェニルアラニン (Phe)	F	147.18	189.9	210
プロリン (Pro)	P	97.12	122.7	145
セリン (Ser)	S	87.08	89.0	115
スレオニン (Thr)	T	101.11	116.1	140
トリプトファン (Trp)	W	186.21	227.8	255
チロシン (Tyr)	Y	163.18	193.6	230
バリン (Val)	V	99.14	140.0	155

<sup>a</sup> アミノ酸の分子量から水の分を差し引いた。値はHandbook of Chemistry and Physics, 43版. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961から取った。

<sup>b</sup> A. A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972からの値。

<sup>c</sup> C. Chothia, J. Mol. Biol. 105: 1-14, 1975からの値。接近表面積はこの文献の図6-20に定義される。

突起形成のための好ましい導入残基は、一般に天然に生じるアミノ酸残基であって、好ましくはアルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）及びトリプトファン（W）から選択される。最も好ましくはトリプトファン及びチロシンである。好ましい実施態様において、突起形成のための元の残基はアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニンまたはバリン等の小さい側鎖体積を有するものである。

“空隙”は、第2のポリペプチドの境界部分から窪んだ少なくとも1個のアミノ酸側鎖を指し、如かして第1のポリペプチドの隣接する境界部分の対応する突起を収容する。該空隙は、元の境界部分に存在してもよく、あるいは合成的に（例えば、境界部分をコードする核酸の変更により）導入されてもよい。通常は、第2のポリペプチドの境界部分をコードする核酸が、空隙をコードするように変更される。これを達成するために、第2のポリペプチドの境界部分内の少なくとも1個の“元々の”アミノ酸残基をコードする核酸が、該元々のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも1個の“導入”アミノ酸残基をコードするDNAに置換される。1個以上の元々の及び導入残基があり得ることは認識されるであろう。置換される元々の残基数の上限は、第2のポリペプチドの境界部分の全残基数である。種々のアミノ残基の側鎖体積は上記の表1に示されている。空隙形成のために好ましい導入残基は、通常は天然に生じるアミノ酸残基であり、好ましくはアラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）及びバリン（V）から選択される。最も好ましくはセリン、アラニンまたはスレオニンである。好ましい実施態様において、突起形成のための元の残基は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニンまたはトリプトファン等の大きい側鎖体積を有する。

“元の”アミノ酸残基は、該元のアミノ酸残基より小さいかまたは大きい側鎖体積を有する“導入”残基により置換されるものである。導入アミノ酸残基は、天然に生じるか、または非天然のアミノ酸残基であり得るが、好ましくは前者で

ある。“天然に生じる”アミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされる残基であって、上記表1に掲げられている。“非天然”のアミノ酸残基は、遺伝子コ

ードによりコードされない残基を意味するが、ポリペプチド鎖において隣接するアミノ酸残基に共有的に結合可能なものである。非天然アミノ酸残基の例は、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン及びEllman等、Meth. Enzym. 202:301-336(1991)に記述されるような他のアミノ酸残基類似体である。このような非天然アミノ酸残基を生じさせるためには、Noren等、Science 244:182(1989)及びEllman等の前出文献の方法が使用されうる。略述すれば、サプレッサー tRNAを非天然アミノ酸残基を用いて化学的に活性化し、次いでRNAをインビトロにて転写、翻訳することを含む。本発明の方法は、少なくとも1個の元のアミノ酸残基を置換することを含むが、1個より多くの元の残基を置換することもできる。通常は、第1または第2のポリペプチドの境界部分の全残基を越えて、元のアミノ酸残基が置換されることはない。置換のための好ましい元の残基は、“埋もれたもの”である。“埋もれたもの”は、本質的に溶媒に接触しない残基を意味する。好ましい導入残基は、起こりうる酸化またはジスルフィド結合の誤った対形成を防ぐためにシステインではない。

突起は、空隙内に“配置可能”であるが、このことは、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドのそれぞれの境界部分の突起及び空隙の空間的配置、並びに突起及び空隙の大きさが、第1及び第2のポリペプチドの境界部分での通常の会合が著しく攪乱されることなく該突起が空隙内に配置され得るものであることを意味する。Tyr、Phe及びTrp等の突起は、境界部分の軸方向から典型的に直角に伸びるものではなく、好ましい形態を持たないため、突起と対応する空隙との整列は、X-線結晶解析または核磁気共鳴(NMR)により得られる3次元構造に基づく突起/空隙対のモデル化を頼りにする。これは、この技術分野で広く受け入れられている技術を使用することにより達成されうる。

“元の核酸”は、突起または空隙をコードするように改変され得る(即ち、遺伝子的に操作されるか、変異される)興味あるポリペプチドをコードする核酸を意味する。元のまたは最初の核酸は、天然に生じる核酸であつてよく、または先行する改変を受けた(例えば、ヒト化抗体断片)核酸を含んでもよい。核酸の“

改変”は、元の核酸が、興味あるアミノ酸残基をコードする少なくとも一つのコ

ドンにおける挿入、除去または置換によって変異生成されることを意味する。通常は、元の残基をコードするコドンが、導入残基をコードするコドンにより置換される。この様な様式でDNAを遺伝子的に修飾する技術は、Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. McPherson, 編 (IRL Press, Oxford, UK (1991)) に総説が与えられ、例えば、部位指向変異生成、カセット変異生成及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 変異生成を含む。

突起または空隙は、例えば、組換え技術、インビトロペプチド合成、酵素的または化学的なペプチド結合による前述の非天然アミノ酸残基を導入するための技術等、あるいはこれらの技術の何らかの組合せによって、合成的手段により第1または第2のポリペプチドの境界部分に“導入”されうる。従って、“導入”された突起または空隙は、“非天然”または“非本来的”であって、このことは、それが天然には、あるいは元のポリペプチドには存在しないことを意味する（例えば、ヒト化モノクローナル抗体）。

好ましくは、突起形成のための導入アミノ酸残基は、比較的少数の“回転異性体”（例えば3-6）を有する。“回転異性体”は、アミノ酸側鎖のエネルギー的に好ましい配位である。種々のアミノ酸残基の回転異性体の数は、Ponders及びRichards, J. Mol. Biol. 193:775-791 (1987) に総説がある。

“単離された”異種多量体は、同定され、及びその天然の細胞培養環境の成分から分離及び／または回収された異種多量体を意味する。その天然環境の夾雑成分は、異種多量体の診断的または治療的使用を妨害しうる物質であって、酵素、ホルモン類、及び多量の蛋白質性または非蛋白質性の溶質を含みうる。好ましい実施態様において、該異種多量体は、（1）ロウリー法により測定される場合に蛋白質重量で95%より多くまで、最も好ましくは重量で99%より多くまで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N-末端または内部アミノ酸配列を少なくとも15残基得るに十分な程度まで、または（3）クーマシーブルー若しくは、好ましくは銀染色を使用して、還元または非還元条件下でのSDS-PAGEにより均質である程度に精製されるであろう。

本発明の異種多量体は、一般的には実質的に均質まで精製される。“実質的に

均質な”、“実質的に均質な形態”及び“実質的均質性”等の句は、生成物が望ましからぬポリペプチドの組合せに由来する副生成物（例えば、同種多量体）を実質的に欠くことを示すために使用される。純度によって表される場合に、実質的均質性は、副生成物の量が重量百分率で10%を越えず、好ましくは5%未満であり、更に好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満であることを意味する。

発現“調節配列”との表現は、特定の宿主生物内で機能可能に結合されたコード配列の発現のために必要なDNA配列を指す。原核生物について適当な調節配列は、例えば、プロモーター、場合によりオペレーター配列、リボソーム結合部位、及び多分、未だに十分理解されていない配列等を含む。真核性細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを使用することが知られている。

核酸は、それが他の核酸配列と機能的に関連性をもって配置される場合に“機能可能に連結”される。例えば、先行配列または分泌先行配列のDNAは、ポリペプチドが前駆蛋白質として発現され、該ポリペプチドの分泌に関与する場合にポリペプチドのDNAに対して機能可能に連結されており；プロモータまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合にコード配列に対して機能可能に連結されており；あるいはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合にコード配列に対して機能可能に連結されている。一般的には、“機能可能に結合”は、連結されるDNA配列が連続的であり、また分泌先行配列の場合には連続かつ読み枠内である。しかしながら、エンハンサーは連続的である必要はない。結合は、都合の良い制限部位にて連結することにより行われる。そのような部位が存在しない場合には、合成オリゴヌクレオチドアダプタまたはリンカーが、常法に従って使用される。

## II. 異種多量体の調製

### 1. 出発材料の調製

第1段階として、第1及び第2のポリペプチド（及び異種多量体を形成するいずれかの付加的なポリペプチド）が選択される。通常は、これらのポリペプチド

をコードする核酸が、ここで定義したような突起または空隙または両者をコードするように改変されるべく、単離される必要がある。しかしながら、変異は、例えばペプチド合成装置を用いて合成的手段を使用して導入されうる。導入残基が非天然残基である場合に、Noren等の前出文献の方法が、そのような置換を有するポリペプチドを調製するために利用可能である。更に、異種多量体の一部分が、細胞培養物にて組換え的に適切に調製され、かつ分子の他の部分が上記技術によって調製される。

抗体の単離及びイムノアդヘシンの調製のための技術が引き続く。しかしながら、異種多量体がこの分野で既知の技術を使用する他のポリペプチドから形成されるか、またはそれを取り込むこともできる。例えば、興味あるポリペプチド（例えば、リガンド、レセプタまたは酵素）をコードする核酸は、該ポリペプチド mRNA を有し、それを検出可能な水準で発現するものと考えられる組織由来の cDNA ライブラリーから単離されうる。該ライブラリーは、興味ある遺伝子またはそれによりコードされる蛋白質を同定するように設計されたプローブ（抗体類または 20-80 塩基のオリゴヌクレオチド）を用いてスクリーニングされる。選択されたプローブを用いる cDNA またはゲノムライブラリーのスクリーニングは、Sambrook 等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) の 10-12 章に記述されているように標準的方法を使用して行われ得る。

#### (i) 抗体調製

抗体生成のための幾つかの技術が記述されており、それらはモノクローナル抗体作成のための伝統的ハイブリドーマ法、抗体作成のための組換え技術（例えば、ヒト化抗体等のキメラ抗体を含む）、トランスジェニック動物における抗体産生、及び最近記述された“完全ヒト”抗体調製のためのファージディスプレイ技術を含む。これらの技術は、以下に略述される。

興味ある抗原に対するポリクローナル抗体は、一般に該抗原及びアジュバントの複数回の皮下（s.c）または腹腔内的（i.p）注射によって、動物内に生じうる。抗原（または標的アミノ酸配列を含む断片）を、免疫される動物種におい

て免疫原性である蛋白質、例えば、キーホールリンペットのヘモシアニン、血清アルブミン、チログロブリン、またはダイズトリプシン阻害酵素等に、二官能性または誘導化剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介しての接合）、グルタルアルデヒド、スクシンアルデヒド、 $\text{SOCl}_2$ 、またはR及びR<sup>1</sup>が異なるアルキル基である $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ 等を使用して結合させることは有用であろう。動物は、1 mg または 1  $\mu$  g の接合体（ウサギまたはマウスのそれぞれについて）を3倍容のフロイント完全アジュバントと合わせ、溶液を複数部位に皮内注射することにより、免疫原性接合体または誘導体に対して免疫される。1カ月後に、動物はフロイント完全アジュバント中の接合体の元の量の1/5～1/10を用いて、複数部位に皮下注射することにより追加免疫される。7～14日後に、動物を採血して血清を抗体力価についてアッセイする。力価がプラトーに至るまで動物は追加免疫を受ける。好ましくは動物は同じ抗原であるが、異なる蛋白質に結合されるか、及び／または異なる交差結合剤を介して結合される接合体により追加免疫を受ける。接合体は、蛋白質融合物として組み換え細胞培養物中でも調製され得る。アルム等の凝集剤も、免疫応答を増強するために使用される。

モノクローナル抗体は、Kohler & Milstein, *Nature* 256:495(1975)により最初に記述されたハイブリドーマ法を使用して実質的に均質な抗体の母集団から得られるか、あるいは組換えDNA法（Cabilly等、米国特許第4,816,567号）によって作成される。ハイブリドーマ法においては、マウスまたはハムスター等の他の適当な宿主動物が、上述のようにして免疫され、免疫に使用した蛋白質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、または産生しうるリンパ細胞を引き出す。別法として、リンパ細胞はインビトロにて免疫されてもよい。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を使用してミエローマ細胞と融合され、ハイブリドーマ細胞が形成される（Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103[Academic Press, 1986]）。斯くして調製されたハイブリドーマは、好ましくは非融合の親ミエローマ細胞の成長または生存を妨げる1種以上の物質を含んだ適切な培地に播種され、育成される。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素ハイポキサンチングアニンホスホリボシルトラ



ンスフェラーゼ (HGPRTまたはHPRT) を欠く場合には、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的にはHGPRT-欠損細胞の成長を阻害する物質であるハイポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう (HAT培地)。好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高水準の抗体発現を支持するもので、かつHAT培地等の培地に感受性の細胞である。これらのうちで好ましいミエローマ細胞系は、ソーキンスティチュート細胞分譲センター、San Diego, California, USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍から誘導されるもの、及びアメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2等のネズミミエローマ系である。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞系も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記述がなされている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001[1984];及びBrodeur等、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。ヒトモノクローナル抗体産生技術に関しては、Boerner等、J. Immunol., 147(1): 86-95(1991)及び1991年11月28日発行のWO91/17769も参照。ハイブリドーマ細胞が生育される培養培地は、興味ある抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降により、あるいは放射イムノアッセイ (RIA) または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 等のインビトロ結合アッセイにより測定される。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107:220(1980)のスキッチャード分析により測定され得る。所望の特異性、親和性及び/または活性をもった抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後には、該クローンは制限希釈法によりサブクローニングされ、標準的方法で育成される。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-104(Academic Press, 1986)。このために好適な培養培地は、Dulbeccoの修飾Eagle培地、またはRPMI-1640培地を含む。更に、ハイブリドーマ細胞は、動物の腹水腫瘍のようにインビボにて育成されてもよい。サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、培養培地、腹水、または血

から例えば、蛋白質Aーセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィー等の慣用のイムノグロブリン精製方法により好適に分離される。

別法として、現在では免疫により、内因性イムノグロブリンの産生なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生しうるトランスジェニック動物（例えばマウス）を作成することが可能である。例えば、キメラ性の生殖系列の変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（ $J_H$ ）遺伝子の同系接合的削除が、内因性抗体産生の完全な阻害を生じたことが記述されている。ヒト生殖系列イムノグロブリン遺伝子配列の、そのような生殖系列変異マウスへの移転は、抗体の攻撃によってヒト抗体の産生を招くであろう。例えば、Jakobovits等、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90:2551-255 (1993) 及び Jakobovits等、Nature 362:255-258 (1993) 参照。

更なる実施態様において、抗体または抗体断片は、McCafferty等、Nature, 348:552-554 (1990) に記述される技術を使用して抗体ファージライブラリーから、適当な抗体または抗体断片を選択するための興味ある抗原を使用して単離される。Clackson等、Nature, 352: 624-628 (1991) 及び Mark等、J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991) は、ファージライブラリーを使用したネズミ及びヒト抗体の単離をそれぞれ記述している。引き続き文献は、鎖混合わせ (shuffling) による高親和性（ $nM$  範囲）のヒト抗体の産生（Mark等、Bio/Technol. 10:779-783 [1992]）、並びに極めて大きいファージライブラリーを構築するための方策として、組合せ感染及びインビボ組換え（Waterhouse等、Nuc. Acids Res., 21:2265-2266 [1993]）を記述している。如かして、これらの技術は、本発明に包含されるモノクローナル抗体（特にヒト抗体）の単離の為の伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な別法である。

本発明の抗体をコードするDNAは、慣用の方法を使用して容易に単離及び配列決定され得る（例えば、ネズミ抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合しうるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる）。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役に立つ。一

且単離されれば、DNAは発現ベクター中に配置され、次いでこれを、サルCO S細胞、モルモット卵巣（CHO）細胞、または別途イムノグロブリンを産生し

ない限りミエローマ細胞等の宿主細胞に感染させ、該組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の産生を得る。DNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常領域についてのコード配列を、同種ネズミ配列に代えて置換することにより修飾されうる；Morrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851(1984)。この様にして、ここに示す抗-抗原モノクローナル抗体の結合特異性を有する“キメラ”抗体が調製される。

非ヒト抗体のヒト化方法は、この分野で周知である。一般的には、ヒト化抗体は非ヒト供給源から導入された1個以上のアミノ酸残基を有している。これらの非ヒトアミノ酸残基は、典型的には“導入”可変領域領域から取られ、しばしば“導入”残基と称される。ヒト化は、基本的にはWinter及び共同研究者等（Jones等、Nature 321:522-525[1986]；Riechman等、Nature 332:323-327[1988]；Verhoeyen等、Science 239:1534-1536[1988]）の方法に従って、齧歯類CDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより行われ得る。従って、そのようなヒト化抗体はキメラ抗体であり（Cabilly, 前出文献）、ここにおいて実質的に完全なヒト可変領域未満の部分が非ヒト動物種に由来する対応する配列によって置換されている。実際的には、ヒト化抗体は、典型的には幾つかのCDR残基及び多分幾つかのFR残基が、齧歯類抗体の類似部位に由来する残基によって置換されたヒト抗体である。抗原に対する高い親和性及び他の望ましい生物学的性質を維持して抗体をヒト化することが重要である。この目標を達成するために、好ましい方法に従って、親及びヒト化配列の3次元イムノグロブリンモデルを使用し、親配列及び種々の概念的ヒト化生成物を分析する工程により、ヒト化抗体が調製された。3次元イムノグロブリンモデルは、当業者にはよく知られている。選択されたイムノグロブリン配列の候補の可能性ある3次元配置構造を例示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を見ることは、候補のイムノグロブリン配列の機能における残基の可能性ある役割の分析、即ち候補のイムノグロブリンのその抗原に結合する能力に影響する

残基の分析が可能となる。この様にして、F R 残基が共通及び導入配列から選択され、結合され得て、標的抗原に対する増大した親和性等の所望の抗体特性が達成される。更なる詳細については、1992年12月23日発行のWO 92/2265

### 3 参照。

#### (ii) イムノアドヘシン調製

イムノグロブリンおよびそのある種の変異体が知られており、多くは国か得細胞培養により調製されている。例えば、米国特許第4,745,055号；E P 256,654号；Faulkner等、Nature 298:286(1982)；E P 120,694；E P 125,023；Morrison, J. Immun. 123:793(1979)；Koehler等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197(1980)；Raso等、Cancer Res. 41:2073(1981)；Morrison等、Ann. Rev. Immunol. 2:239(1984)；Morrison, Science 229:1202(1985)；Morrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851(1984)；E P 255,694；E P 266,663；及びWO 88/03559参照。再分類されたイムノグロブリンも知られている。例えば、米国特許第4,444,878号；WO 88/03565；及びE P 68,763並びにそれらに引用された文献参照。

適切なイムノグロブリン定常領域配列に結合されたアドヘシン結合領域配列から構築されたキメラ（イムノアドヘシン）は、この分野で知られている。文献中に報告されたイムノアドヘシンは、T細胞レセプタ（Gascoigne等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940[1987]）；C D 4（Capon等、Nature 337:525-531[1989]；Traunecker等、Nature 339:68-70[1989]；Zettmeissl等、DNA Cell Biol. USA 9:347-353[1990]；及びByrn等、Nature 344:667-670[1990]）；L-セレクトイン（帰巢レセプタ）（Watson等、J. Cell. Biol. 110:2221-2229[1990]；及びWatson等、Nature 349:164-167[1991]）；C D 4 4（Aruffo等、Cell 61:1303-1313[1990]）；C D 2 8及びB 7（Linsley等、J. Exp. Med. 173:721-730[1991]）；C T L A-4（Linsley等、J. Exp. Med. 174:561-569[1991]）；C D 2 2（Stamenko vic等、Cell 66:1133-1144[1991]）；T N F レセプタ（Ashkenazi等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539[1991]；Lesslauer等、Eur. J. Immunol. 27:2883-2886[1991]；及びPeppel等、J. Exp. Med. 174:1483-1489[1991]）；並びにI g E レ

セプタ $\alpha$  (Ridgway及びGorman, J. Cell. Biol. 115巻、要約番号1448[1991]) の融合物を含む。

最も単純かつ直接的なイムノアドヘシンの設計は、アドヘシン (例えば、レセプタの細胞外領域 [ECD]) を、イムノグロブリン重鎖のヒンジ及びFc領域

と組み合わせることである (図3参照)。通常、本発明のイムノアドヘシンを調製する場合に、アドヘシンの結合領域をコードする核酸が、イムノグロブリン定常領域配列のN-末端をコードする核酸に、C-末端側において融合されるが、N-末端側の融合も可能である。

典型的には、このような融合物において、コードされるキメラポリペプチドは、少なくともイムノグロブリン重鎖の定常領域の機能的な活性ヒンジ、 $C_H2$  及び  $C_H3$  領域が維持されるであろう。融合物は、定常領域のFc部分のC-末端、または直接に重鎖の $C_H1$  のN-末端に、あるいは軽鎖の対応する領域にも作成されうる。融合が作られる正確な部位は重要ではなく；特定の部位は周知であり、Iaの生物学的活性、分泌、または結合特性を最適化するために選択され得る。

好ましい実施態様において、アドヘシン配列は、イムノグロブリン $G_1$  (IgG<sub>1</sub>) のFc領域のN-末端に融合される。全重鎖定常領域をアドヘシン配列に融合することが可能である。しかしながら、より好ましくはIgG-Fcをキメラ的に定義するバザイン切断部位の直ぐ上流のヒンジ領域において始まる配列 (即ち、重鎖定常領域の第1の残基を114位として、216位の残基)、または他のイムノグロブリンの同様な部位が、融合において使用される。特に好ましい実施態様において、アドヘシニアミノ酸配列は、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>またはIgG<sub>3</sub>重鎖の (a) ヒンジ領域及び $C_H2$  及び $C_H3$ 、あるいは (b)  $C_H1$ 、ヒンジ、 $C_H2$  及び $C_H3$  領域と融合される。融合物が生成される正確な部位は臨界的なものではなく、最適部位は機械的な実験により決定されうる。

二重特異的イムノアドヘシンについては、該アドヘシンは多量体、特に異種二量体または異種四量体として組み立てられる。一般に、これらの組み上げられたイムノグロブリンは、既知の単位構造を有するであろう。基本的な4本鎖構造

単位は、I g G、I g D及びI g Eが存在する形態である。四本鎖単位はより高分子量のイムノグロブリンにおいては反復され；I g Mはジスルフィド結合のより一緒に維持された四個の基本単位の5量体として存在する。I g Aグロブリン及び場合によりI g Gグロブリンは、血清中において多量体形態においても存在し得る。多量体において、四個の単位のそれぞれは同一でも異なってもよい。

ここにおいて範囲内にある種々の例示的な組み上げられたイムノアドヘシンは

、

以下に模式的に図表化される：

- (a)  $AC_L-AC_L$ ；
- (b)  $AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, \text{または} V_LC_L-AC_H]$ ；
- (c)  $AC_L-AC_H-[AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, \text{または} V_LC_L-V_HC_H]$ ；
- (d)  $AC_L-V_HC_H-[AC_H, \text{または} AC_L-V_HC_H, \text{または} V_LC_L-AC_H]$ ；
- (e)  $V_LC_L-AC_H-[AC_L-V_HC_H, \text{または} V_LC_L-AC_H]$ ；及び
- (f)  $[A-Y]_n-[V_LC_L-V_HC_H]_2$

ここにおいて、各Aは、同一または異なったアドヘシンアミノ酸配列を表し；

$V_L$ は、イムノグロブリン軽鎖可変領域であり；

$V_H$ は、イムノグロブリン重鎖可変領域であり；

$C_L$ は、イムノグロブリン軽鎖定常領域であり；

$C_H$ は、イムノグロブリン重鎖定常領域であり；

nは、1より大きい整数であり；

Yは、共有的交差結合剤の残基を示す。

簡潔さのために、上記構造は主要な特徴のみを示し；それらは結合(J)またはイムノグロブリンの他の領域を示しておらず、またジスルフィド結合も示されない。しかしながら、この様な領域が結合活性について要求される場合には、それらはイムノグロブリン分子中に占める通常的位置に存在するように構築されるであろう。

別法として、アドヘシン配列は、イムノグロブリン重鎖及び軽鎖の間に挿入されることもでき、如かしてキメラ重鎖を有するイムノグロブリンが得られる。こ

の実施態様においては、アドヘシン配列は、イムノグロブリンの各アームのイムノグロブリン重鎖の3'末端に、ヒンジ及びC<sub>H</sub>2領域の間、あるいはC<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3領域の間のいずれかにおいて融合される。同様な構築物が、Hoogenboom等、Mol. Immunol. 28: 1027-1037(1991)により報告されている。

本発明のイムノアドヘシンにおいてはイムノグロブリン軽鎖の存在は必要とされないが、イムノグロブリン軽鎖は、アドヘシン-イムノグロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合的に伴われるか、あるいはアドヘシンに直接融合するいず

れかとして存在するであろう。前者の場合には、イムノグロブリン軽鎖をコードするDNAは、典型的にはアドヘシン-イムノグロブリン重鎖融合蛋白質をコードするDNAと共に発現される。分泌において、ハイブリッド重鎖及び軽鎖は、共有結合的に一緒になって、2個のジスルフィド結合イムノグロブリン重鎖-軽鎖対を有するイムノグロブリン様構造を与えるであろう。このような構造の調製のために適当な方法は、1989年3月28日発行の米国特許第4,816,567号に開示されている。

好ましい実施態様において、本発明のイムノアドヘシンの構築において使用されるイムノグロブリン配列は、IgGイムノグロブリン重鎖定常領域由来のものである。ヒトイムノアドヘシンについては、ヒトIgG<sub>1</sub>及びIgG<sub>3</sub>イムノグロブリン配列の使用が好ましい。IgG<sub>1</sub>を使用することの主な優位点は、IgG<sub>1</sub>イムノアドヘシンが固定化蛋白質Aにて効率的に精製され得ることである。対照的にIgG<sub>3</sub>の精製は、優位に用途が狭い媒質である蛋白質Gを必要とする。しかしながら、特定のイムノアドヘシン構築のためにIg融合相手を選択する場合には、イムノグロブリンの別の構造的及び機能的性質も考慮されなければならない。例えば、IgG<sub>3</sub>ヒンジは、より長く、より柔軟性を有するもので、IgG<sub>1</sub>に融合した場合には折り畳まれず、あるいは適切に機能しないより大きい“粘着”領域に適合しうる。他の考慮点は、抗体価であって；IgGイムノアドヘシンは、2価の同種二量体であり、その一方でIgA及びIgM等のIgサブタイプは基本的Ig同種二量体単位の二量体的または五量体的構造を生じるであろう。インビボでの応用のために設計されるイムノアドヘシンについては、Fc領域に

よって特定される薬理動態的性質及びエフェクター機能も重要である。I g G<sub>1</sub>、I g G<sub>2</sub>及びI g G<sub>4</sub>は、全て21日のインビボ半減期を有するが、それらの補体系活性化における相対的能力は異なっている。I g G<sub>4</sub>は補体を活性化せず、またI g G<sub>2</sub>は、補体活性化についてI g G<sub>1</sub>より顕著に弱い。更にI g G<sub>1</sub>とは異なって、I g G<sub>2</sub>は、単核細胞または好中球のFcレセプタに結合しない。I g G<sub>3</sub>は、補体活性化について至適であるが、そのインビボ半減期は他のI g Gアイソタイプに比べておよそ3分の1である。ヒト治療薬として使用すべく設計されるイムノアドヘシンについての他の重要な考慮点は、特定のアイソタイプのアロタイプ変

異体の数である。一般に、血清学的に定義されるアロタイプが少ないI g Gアイソタイプほど好ましい。例えば、I g G<sub>1</sub>は4個のみの血清学的に定義されるアロタイプ部位を有し、それらのうち2個（G1m1及び2）は、Fc領域に位置し；これらの部位の一つ、G1m1は、非免疫原性である。対照的に、I g G<sub>3</sub>には12個の血清学的に定義されるアロタイプが存在し、それら全てがFc領域に存在し、これらの部位のうち僅かに3個（G3m5、11及び21）のみが非免疫原性の一つのアロタイプを有する。従って、γ3イムノアドヘシンの潜在的免疫原性は、γ1イムノアドヘシンに比べて高い。

イムノアドヘシンは、アドヘシン部分をコードするcDNAを、I g cDNA配列に読み枠内で融合することにより最も都合良く構築される。しかしながら、ゲノムI g断片に対する融合も使用され得る（例えば、Gascoigne等の前出文献；Aruffo等、*Cell* 61:1303-1313[1990]；及びStamenkovic等、*Cell* 66:1133-1144[1991]参照）。融合の后者のタイプは、発現のためのI g制御配列の存在を必要とする。I g G重鎖定常領域をコードするcDNAは、脾臓または末梢血リンパ球から誘導されるcDNAライブラリーから、文献記載の配列に基づいてハイブリダイゼーションにより、あるいはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術により単離されうる。イムノアドヘシンの“アドヘシン”及びI g部分をコードするcDNAは、選択された宿主細胞において効率的な発現を支配するプラスミドベクターにタンデムに挿入される。



## 2. 突起及び／または空隙の創製

突起及び／または空隙を形成するための元の残基の選択の第一の工程として、異種多量体の3次元構造が、X線結晶解析法またはNMR等のこの分野で周知の技術を使用して得られた。3次元構造に基づき、当業者は境界部分残基を同定することができるであろう。

好ましい境界部分は、イムノグロブリン定常領域のC<sub>H</sub>3領域である。IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMのC<sub>H</sub>3領域の境界部分残基は、導入残基による置換のために至適なものも含めて図5に特定されている。種々のIgGサブタイプの境界部分残基は、図6に例示されている。“埋もれた”残基も特定されて

いる。C<sub>H</sub>3境界部分の操作の基礎は、X線結晶解析がFc領域におけるヒトIgG<sub>1</sub>重鎖間の分子間会合が、C<sub>H</sub>3領域間の広範囲な蛋白質／蛋白質相互作用を含み、一方でグリコシル化されたC<sub>H</sub>2領域はそれらの炭化水素を介して相互作用することが例示されたことにある(Deisehofer, *Biochem.* 20:2361[1981])。加えて、重鎖が切断されてC<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域が除去されない限り、哺乳動物細胞での抗体発現において効率的に形成された2本の重鎖間のジスルフィド結合が存在する(King等、*Biochem. J.* 281:317[1992])。従って、重鎖会合はジスルフィド結合形成を、促進するものと考えられ、むしろその逆ではない。これらの構造的及び機能的データを合わせ見ると、抗体重鎖の会合は、C<sub>H</sub>3領域に支配されとの仮説が導かれる。更に、C<sub>H</sub>3領域間の境界部分は、異なった重鎖の異種多量体形成を促進し、対応する同種多量体の組立を阻害するために操作されることが推定される。ここに記述される実験は、この方法論を使用して、同種多量体を上回って異種多量体の形成が促進可能であったことを例示する。如かして、第1または第2のポリペプチドを形成するための興味あるポリペプチド及び抗体のC<sub>H</sub>3領域を含んでなるポリペプチド融合体を創製することが可能である。好ましいC<sub>H</sub>3領域は、ヒトIgG<sub>1</sub>等のIgG抗体から誘導される。ヒトIgG<sub>1</sub>の境界部分残基は、図7に示される。

これらの突起または空隙形成の為の候補となりうる境界部分残基が特定される

。置換するために“埋もれた”残基を選択することが望ましい。残基が埋もれたものであるかを決定するために、Lee等、J. Mol. Biol. 55:379-400(1971)の表面接近性プログラムを使用して、境界部分の残基の溶媒接近性（SA）を計算することができる。従って、他方のポリペプチドを取り去った後に第1および第2のポリペプチドの各々について残基のSAが別個に計算されうる。境界部分の単量体及び二量体形態の間の各残基のSAの差が、次のように計算される：SA（二量体）－SA（単量体）。これは、二量体形成においてSAを失う残基のリストを提供する。二量体における各残基のSAは、X＝興味あるアミノ酸である場合のトリペプチド、G l y－X－G l yにおける同じアミノ酸の理論的SAと比較される（Rose等、Science 229:834-838[1985]）。（a）単量体に比べて二量体でSAを失い、かつ（b）対応するトリペプチドのものに対して26%未満のSAを

有する残基が、境界部分残基として考慮される。二つの種類、即ちそれらの対応するトリペプチドに比較してSA<10%を有する（即ち“埋もれた”）もの、及び対応するトリペプチドに比較して25%>SA>10%を有する（即ち、“部分的に埋もれた”）ものが描かれるであろう。

表 2

残基番号 <sup>1</sup>	S A 損失単量体→二量体		%トリペプチド	
	ポリペプチド	ポリペプチド	ポリペプチド	ポリペプチド
	A	B	A	B
Q347	22.1	31.0	25.0	26.5
Y349	79.8	83.9	5.2	5.7
L351	67.4	77.7	3.9	2.0
S354	53.4	52.8	11.3	11.7
E357	43.7	45.3	0.4	1.3
S364	21.5	15.1	0.5	1.4
T366	29.3	25.8	0.0	0.1
L368	25.5	29.7	1.0	1.1
K370	55.8	62.3	11.5	11.0
T394	64.0	58.5	0.6	1.4
V397	50.3	49.5	13.2	11.0
D399	39.7	33.7	5.7	5.7
F405	53.7	52.1	0.0	0.0
Y407	89.1	90.3	0.0	0.0
K409	86.8	92.3	0.7	0.6
T411	4.3	7.5	12.7	9.8

<sup>1</sup> I g G 結晶構造における残基番号 (Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370 [1981])

ポリペプチド鎖構造における残基置換の効果は、Insight<sup>TM</sup>プログラム (Biosym Technologies) 等の分子グラフィクスモデル化プログラムを使用して研究しうる。このプログラムを使用して、例えば、小さい側鎖体積を有する第1のポリペプチドの境界部分の埋もれた残基を、より大きい側鎖体積を有する残基 (即ち突起) に変更しうる。次いで、突起に近接する第2のポリペプチドの境界部分の残基が、空隙を形成するために適切な残基を見い出すべく検査される。通常、この残基は大きい側鎖体積を有し、これがより小さい側鎖体積を有する残基

に置換される。ある実施態様において、境界部分の3次構造の検査は、第1のポリペプチドの境界部分に適切に配置され、大きさの決められた突起、または第2のポリペプチドの境界部分の空隙を明らかにするであろう。これらの例において、単一の変異体、即ち、合成的に導入された突起または空隙を持つもののモデル化のみが必要である。

第1および第1のポリペプチドが各々 $C_{H3}$ 領域を含む場合に、置換について可能性ある元の残基を選択することの関しては、ヒトIgG<sub>1</sub>の $C_{H3}/C_{H3}$ 境界は各表面から1090Å<sup>2</sup>を埋める4本の逆平行の $\beta$ -鎖上に位置する各領域に、16個の残基を含む(Deisenhofer、前出文献及びMiller, *J. Mol. Biol.* 216:965[1990])。これに添付の図7参照。変異は、好ましくは2本の中央の逆平行 $\beta$ -鎖上に位置する残基を標的とする。この目標は、生成される突起が、相手の $C_{H3}$ 領域の補完的空隙ではなくして周囲の溶媒中に突出することによって適応されうる危険性を小さくする。

分子モデルによって一旦好ましい元々／導入残基が同定されれば、アミノ酸の置換は、この分野で周知の技術を使用してポリペプチドに導入される。通常は、該ポリペプチドをコードするDNAが、Mutagenesis: a Practical Approach, 前出文献に記述される技術を使用して、遺伝子的に操作される。

オリゴヌクレオチド-媒介変異生成は、第1および第2のポリペプチドをコードするDNAの置換変異体調製のために好ましい方法である。この技術は、Adelman等、DNA, 2:183(1983)により記述されているようにこの分野で周知である。略述すれば、第1および第2のポリペプチドは、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドを、異種多量体の未改変または天然のDNA配列を含むプラスミドま

たはバクテリオファージの単鎖形態のDNAテンプレートにハイブリダイズさせることにより改変される。ハイブリダイゼーションの後に、オリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、異種多量体DNAにおいて選択された改変をコードするであろうテンプレートの第2の相補鎖全体を合成するためにDNAポリメラーゼが使用される。

カセット変異生成は、Well等、Gene 34:315(1985)に記述されるように、興味あるDNAの領域を、相補的オリゴヌクレオチドにアニール化することにより生成された合成的変異断片により置換することによって行われ得る。PCR変異生成も、第1および第2のポリペプチドDNAの変異体を作成するために好適である。下記の議論においてはDNAを引用するが、この技術はRNAに対しても応用が見い出されるものと理解される。PCR技術は、一般に下記の方法が参照される(Erlich, Science, 252:1643-1650[1991], R. Higuchiによる章, p 61-70参照)。

この発明は、突起または空隙の変異に加えて、適切なヌクレオチド変化を異種多量体DNAに導入するか、あるいは所望の異種多量体ポリペプチドの合成により調製される異種多量体のアミノ酸配列変異を包含する。この様な変異体は、例えば、異種多量体を形成する第1および第2のポリペプチドのアミノ酸配列内の残基に、削除、または挿入若しくは置換を含む。削除、挿入及び置換の任意の組合せは、最終構築物が所望の抗原結合特性を有する限り、最終構築物に到達する。アミノ酸の変更は、グリコシル化部位の数また配置の変化等の異種多量体の翻訳後工程を変えるであろう。

変異生成のために好ましい位置にある異種多量体のある残基または領域を同定する有用な方法は、Cunningham及びWells, Science, 244:1081-1085(1989)により記述されるように“アラニン走査変異生成”と称される。これにおいては、ある残基または標的残基の基が特定され(例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGlu等の電荷を持つ残基)、中性または負電荷のアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)により置換されて、細胞内または外の水性環境とのアミノ酸の相互作用に影響を与える。置換に対して機能的に感受性であることが示される領域は、次いで置換部位においてまたはそれに対して更なる、または他の変異を導入することにより改善される。従って、アミノ酸配列変化が導入

される部位は予め特定されるが、変異の性質自体は予め決定される必要がない。通常は、変異は異種多量体の非機能領域において保存的アミノ酸の置換を含む。

例示的変異が、下記の表に示される。

表 3

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; Phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

異種多量体ポリペプチドの共有結合的修飾も本発明の範囲に含まれる。異種多量体の共有結合的修飾は、異種多量体またはその断片の標的アミノ酸残基を、選択される側鎖、またはN-末端若しくはC-末端残基と反応しうる有機誘導試薬と反応させることによって分子に導入されうる。本発明の範囲に含まれる異種多量体ポリペプチドの他の共有結合的修飾は、ポリペプチドの天然のグリコシル化パターンの変更を含む。変更は、元の異種多量体に見い出される1個以上の炭水

化物残基の除去、及び／または元の異種多量体に存在しない1個以上のグリコシル化部位の付加を意味する。異種多量体に対するグリコシル化部位の付加は、1個以上のN-結合グリコシル化部位を含む様にアミノ酸配列を改変することにより都合良く達成される。変更は、元の異種多量体配列に対して、1個以上のセリンまたはスレオニン残基の付加または置換（O-結合グリコシル化部位について）を行うことによって成され得る。簡便さのため、異種多量体アミノ酸配列は、好ましくはDNA水準での変更を介して、特に異種多量体ポリペプチドをコードするDNAを、所望のアミノ酸に翻訳されるようなコドンを生じる様に予め選択された塩基において変異させることによって変更される。異種多量体ポリペプチド上に炭水化物残基数を増加させる別の方法は、グリコシドのポリペプチドに対する化学的または酵素的な結合である。これらの方法は、1987年9月11日発行のWO 87/05330、及びAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306(1981)に記述されている。異種多量体に存在する炭水化物残基の除去は、化学的または酵素的に行われ得る。

異種多量体の他のタイプの共有結合的修飾は、異種多量体ポリペプチドを、種々の非蛋白質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレンのうちの一つに、米国特許第4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192または4,179,337に示されるようにして結合することを含む。

変異異種多量体の性質を先に予測することはしばしば困難であるため、至適な変異体を選択するためには回収される変異種のある種のスクリーニングが必要であることは認識されるであろう。

### 3. 異種多量体の発現

前節にて検討したように、DNAの変異に続いて、分子をコードするDNAは、この分野で広く利用可能な組換え技術を使用して発現される。しばしば選択される発現系は、異種多量体が適切にグリコシル化されるように（例えば、グリコシル化された抗体領域を含む異種多量体の場合）、哺乳動物細胞の発現ベクター及び宿主を含む。しかしながら、下記に詳細に検討するように分子を原核性発現

系にて産生させることもできる。通常は、宿主細胞は、単一ベクターまたは独立した複数ベクター上の、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両者並びに異種多量体を形成するために必要な他のポリペプチドをコードするDNAにより形質転換される。しかしながら、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを独立した発現系にて発現させ、外発現されたポリペプチドをインビトロにて結合させることも可能である。

異種多量体をコードする核酸（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）は、更なるクローニング（DNAの増幅）または発現の為に複製可能なベクターに挿入される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの成分は、限定されるものではないが、次の1種以上を含む：シグナル配列、複製のオリジン、1種以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終止配列。

異種多量体のポリペプチドは、シグナル配列または成熟蛋白質若しくはポリペプチドのN-末端に特異的な切断部位をもった他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして産生されうる。一般的には、シグナル配列はベクターの部品であるか、あるいはベクターに挿入されるDNAの一部であり得る。選択される異種シグナル配列は、好ましくは宿主細胞によって認識され、処理される（即ち、シグナルペプチド一単位により切断される）ものである。原核性宿主細胞については、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーからなる群から選択される原核性シグナル配列に置換され得る。酵母分泌については、天然のシグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、アルファ因子リーダー（サッカロマイセス及びクレイペロマイセス (*Kluyveromyces*)  $\alpha$ -因子リーダー、後者は1991年4月23日発行の米国特許第5,010,182号に記述される）、または酸ホスファターゼリ

ーダー、C. アルビカンスグルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日発行のEP362,179）、または1990年11月15日発行のWO90/13646に記載のシグナル等によって置換されてもよい。哺乳動物細胞発現において、天然のシグナル配列（例えば、通常インビボにおいてヒト細胞からのこれらの分子の分泌を



支配する抗体またはアドヘシンの先行配列)は、充分なものであるが、例えば単純ヘルペス g D シグナル等のウイルス性分泌リーダーに加えて他の哺乳動物シグナル配列も好適であり得る。この様な前駆体領域の DNA は、異種多量体を形成するポリペプチドをコードする DNA に対して読み枠内で連結される。

発現及びクローニングベクターの両者は、1 種以上の選択される宿主細胞内でベクターが複製することを可能とする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいては、この配列は宿主染色体 DNA とは独立して、ベクターが複製することを可能とするもので、複製のオリジンまたは自己複製配列を含む。この様な配列は、種々の細菌、酵母及びウイルスについて周知である。プラスミド pBR322 由来の複製オリジンは、殆どのグラム陰性細菌に適しており、2  $\mu$  プラスミドオリジンは、酵母に適しており、また種々のウイルスオリジン (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV または BPV) は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製部品のオリジンは、哺乳動物発現ベクターについては必要はない (SV40 オリジンは、それが早期プロモーターを含むために典型的に使用される)。

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含まなければならない。典型的な選択遺伝子は、(a) 例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリン等の抗生物質または他のトキシンにたいする耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠損を補う、または (c) 例えば、バチルス D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子のように複合培地から得られない重要な栄養素を供給する蛋白質をコードする。選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を阻止する薬剤を使用する。異種遺伝子により成功裏に形質転換されたそれらの細胞は、薬剤耐性を与える蛋白質を産生し、従って、選択培養において生き延びる。この様な優勢選択の例は、ネオマイシン (Southern 等、J. Molec. Appl. Genet. 1: 327[1982])、マイコフェノール酸

(Mulligan 等、Science 209:1422[1980]) またはハイグロマイシン (Sugden 等、Hol. Cell. Biol. 5:410-413[1985]) 等の薬剤を使用する。上記の 3 種の例は、適切な薬剤、G 418 またはネオマイシン (ゲネチシン)、x g p t (マイコフ

ェノール酸) またはハイグロマイシンに対する耐性を与えるために、それぞれ真核性の制御下において細菌性遺伝子が使用される。

哺乳動物細胞についての適当な選択マーカーの別の例は、DHFRまたはチミジンキナーゼ等の異種多量体核酸を取り上げる為に有能な細胞の同定を可能とするものである。哺乳動物の形質転換は、マーカーを取り上げることによって形質転換体が生存するために固有に適合する選択圧のもとにおかれる。選択圧は、媒質中の選択剤濃度が順次変化させられ、これによって選択遺伝子及び異種多量体をコードするDNAの両者の増幅が導かれるような条件下で、形質転換体を培養することにより負荷される。異種多量体の増大された量は、増幅されたDNAから合成される。増幅可能な遺伝子の別の例は、メタロチオネインーI及びーII、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等を含む。

例えば、DHFR選択遺伝子により形質転換された細胞は、最初に全ての形質転換体をDHFR拮抗剤であるメトトレキセート(Mtx)を含む培養培地中で培養することにより同定される。天然型DHFRを採用した場合、適切な宿主細胞は、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980)に記述されているように調製され、増殖されたDHFR活性を欠失するモルモットの卵巣(CHO)細胞である。次いで、形質転換された細胞は増大する濃度のメトトレキセートに曝される。これは、DHFR遺伝子の複数コピーの合成を導き、付随して異種多量体の部分をコードするDNA等の発現ベクターを含む他のDNAの複数コピーを合成する。この増幅技術は、例えば、Mtxに対して高度に耐性である変異DHFR遺伝子が採用された場合に、内因性DHFRの存在に関わらず例えばATCC No. CCL 61 CHO-K1等の任意の適当な宿主に利用できる(EP117,060)。

別法として、異種多量体、天然型DHFR蛋白質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)等の他の選択可能なマーカーをコードす

るDNA配列により形質転換または共形質転換された宿主細胞(特には内因性DHFRを含む天然型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418等

のアミノグリコシド抗生物質等の選択マーカー様の選択試薬を含む培地中で細胞培養することにより選択され得る。米国特許第4,965,199号参照。

酵母において使用するための適当な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcob等、Nature 282:39[1979]; Kingsman等、Gene 7:141[1979]; またはTschemper等、Gene 10: 157[1980])。trp1遺伝子は、例えば、ATCC No. 44076またはPEP4-1等のトリプトファン中での生育能力を欠く酵母の変異株に対して選択マーカーを与える(Jones, Genetics 85:12[1977])。酵母宿主細胞ゲノム中のtrp1損傷の存在は、トリプトファンの不在下での生育による形質転換の検出のための有効な環境を与える。同様に、Leu2-欠損酵母株(ATCC 20,622または38,626)は、Leu2遺伝子を保有する既知のプラスミドにより補完される。

更に、1.6  $\mu$ m環状プラスミドpKD1から誘導されるベクターは、クルイペロマイセス酵母の形質転換のために使用され得る。Bianchi等、Curr. Genet. 12:185 (1987)。更に最近には、組換え子牛キモシンの大規模産生のための発現系が、K. ラクティス (K. lactis) について報告されている。Van den Berg, Bio/Technology 8:135(1990)。クルイペロマイセスの工業用株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌用の安定な複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleer等、Bio/Technology 9:968-975(1991)。

発現及びクローニングベクターは、通常は宿主生物に認識され、異種多量体核酸に機能的に連結されるプロモーターを含む。種々の可能性ある宿主細胞に認識される多くのプロモーターが周知である。これらのプロモーターは、制限酵素消化により供給源DNAからプロモーターを取り出し、単離されたプロモーター配列をベクター中に挿入することにより、異種多量体コードDNAに機能的に連結される。

原核性宿主と共に使用するために適したプロモーターは、 $\beta$ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系(Chang等、Nature 275:615[1978];及びGoeddel等、Nature 281:544[1979])、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)

プロモーター系 (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057[1980]及びE P 36, 776) 並びに t a c プロモーター等のハイブリッドプロモーター (deBoer等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25[1983]) を含む。しかしながら、他の既知の細菌性プロモーターも適している。それらのヌクレオチド配列は文献に記載されており、これによって熟練した研究者が、いずれかの必要とされる制限部位を供給する為のリンカーまたはアダプターを使用して、それらを異種多量体をコードする DNA (Siebenlist等、Cell 20:269[1980]) に機能的に連結することを可能としている。細菌系において使用されるプロモーターは、異種多量体をコードする DNA に機能的に連結されたシャイン・ダルガルド (S. D.) 配列も含むであろう。

プロモーター配列は、真核細胞系についても知られている。実質的には、全ての真核性遺伝子は、転写開始部位から約 25～30 塩基上流に位置する AT 富有領域を有している。多くの遺伝子の転写開始から 70～80 塩基上流に見い出される他の配列は、X が任意のヌクレオチドであり得る C X C A A T 領域である。殆どの真核性遺伝子の 3' 末端は、コード配列の 3' 末端にポリ A テイルを付加するシグナルであり得る A A T A A A 配列である。これらの配列の全ては、真核性発現ベクターに適切に挿入される。

酵母宿主により使用するための適当なプロモーター配列の例は、3-ホスホグリセレートキナーゼのプロモーター (Hitzeman等、J. Biol. Chem. 255:2073[1980]) または他の解糖酵素 (Hess等、J. Adv. Enzyme Reg. 7:149[1968]; 及び Holland, Biochemistry 17:4900[1978])、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートミューターゼ、ビルベートキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼ等のプロモーターを含む。

育成条件により制御される転写という付加的優位点を有する誘導可能なプロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソサイトクローム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に伴う分解酵素、メタロチオネイ

ン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、並びにマルト-

ス及びガラクトース利用に関与する酵素のプロモーター領域である。酵母発現において使用するために好適なベクター及びプロモーターは、Hitzeman等、EP 73, 657Aに更に記述されている。酵母エンハンサーも、酵母プロモーターと共に有利に使用される。

哺乳動物宿主細胞中でのベクターからの異種多量体転写は、例えば、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス（1989年7月5日発行のUK 2, 211, 504）、アデノウイルス（アデノウイルス2等）、ウシパピローマウイルス、トリサルコーマウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び最も好ましくはサルウイルス40（SV40）等のウイルスゲノム由来、例えばアクチンプロモーターまたはイムノグロブリンプロモーター等の異種哺乳動物プロモーター由来、または熱ショックプロモーター由来にて得られるプロモーターによって制御される。

SV40ウイルスの初期または後期プロモーターは、SV40ウイルス性複写オリジンも含むSV40制限断片として都合良く得られる。Fiers等、*Nature* 273:113(1978); Mulligan and Berg, *Science* 209:1422-1427(1980); Pavlakis等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7398-7402(1981)。ヒトサイトメガロウイルスの即時型プロモーターは、Hind III E制限断片として都合良く得られる。Greenaway等、*Gene* 18:355-360(1982)。ベクターとしてウシパピローマウイルスを使用する哺乳動物宿主におけるDNA発現系は、米国特許第4, 419, 446号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4, 601, 978号に記述されている。サル細胞における免疫インターフェロンをコードするcDNAの発現について、Gray等、*Nature* 295:503-508(1982); 単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下におけるマウス細胞中でのヒト $\beta$ -インターフェロンcDNAの発現について、Reyes等、*Nature* 297:598-601(1982); 培養されたマウス及びウサギ細胞中でのヒトインターフェロン $\beta$  1遺伝子の発現について、Canaan i and Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5166-5170(1982); ラウスサルコーマウイルスの長末端反復をプロモーターとして使用するCV-1サル腎細胞、ニ

ワトリ胚線維芽細胞、モルモット卵巣細胞、H e L a 細胞及びマウスN I H-3 T 3 細胞における細菌性C A T 配列の発現について、Gorman等、Proc.Natl. Acad. Sci USA 7

9:6777-6781(1982)も参照。

より高度な真核性細胞による異種多量体をコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによりしばしば増大される。エンハンサーは、相対的には配向及び位置に依存せず、転写単位の5' (Laimins等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:993[1981])及び3' (Lusky等、Mol. Cell Bio. 3:1108[1983])、イントロン内 (Banerji等、Cell 33:729[1983])並びにコード配列それ自体内部 (Osborne等、Mol. Cell Bio. 4:1293[1984])に見い出されている。今日では多くのエンハンサー配列が哺乳動物遺伝子から知られている (グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェト蛋白及びインシュリン)。しかしながら、典型的には真核性細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用されるであろう。例としては、複写オリジンの後期側にあるSV40エンハンサー (b p 1 0 0-2 7 0)、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複写オリジンの後期側に位置すポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーを含む。真核性プロモーターの活性化の増強要素については、Yaniv, Nature 297:17-18(1982)も参照。エンハンサーは、異種多量体コード配列の5' または3' 位置においてベクター中にスプライスされ得るが、好ましくはプロモーターの5' 部位に配置される。

真核性宿主細胞 (酵母、真菌、昆虫、動物、ヒト、または他の複細胞有機体由来の有核細胞) は、転写終了及びmRNAの安定化に必要な配列を含むであろう。このような配列は、真核性またはウイルス性DNAまたはcDNAの5' 及び場合により3' 非翻訳領域から一般に入手可能である。これらの領域は、異種多量体をコードするmRNAの非翻訳部分においてポリアデニル化された断片として転写されるヌクレオチド部分を含む。

上記にあげた1種以上の部品を含む適当なベクターの構築は、標準的連結技術を使用する。単離されたプラスミドまたはDNA断片は、必要とされるプラスミ

ドを生成させるために要求される形態に切断され、つなぎ合わされ、再度連結される。

構築されたプラスミドにおいて正しい配列を確認するための分析には、連結混合物が、E. coli K12 294株(ATCC 31,446)を形質転換す

るために使用され、成功した形質転換体が適当な場合にアンピシリンまたはテトラサイクリン耐性により選択される。形質転換体からのプラスミドが調製され、制限エンドヌクレアーゼにより分析され、及び／またはMessing等、Nucleic Acids Res. 9:309(1981)の方法、若しくはMaxam等、Methods in Enzymology 65:499(1980)の方法により配列決定される。

この発明の実施において特に有用なものは、異種多量体をコードするDNAの哺乳動物細胞における一時的発現を与える発現ベクターである。一般に、一時的発現は、宿主細胞において効率的複製を可能とする発現ベクターの使用を含み、如かして宿主細胞が発現ベクターの多数のコピーを蓄積し、次いで該発現ベクターによりコードされる所望のポリペプチドを高水準で合成する。Sambrook等、前出文献pp. 16. 17-16. 22。好適な発現ベクター及び宿主細胞を有する一時的発現系は、クローン化されたDNAによりコードされるポリペプチドの都合良い陽性の同定を可能とし、並びに所望の結合特異性／アフィニティを有する異種多量体の迅速なスクリーニングを可能とする。

組換え脊椎動物細胞における異種多量体の合成に適用するために好適な他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gething等、Nature 293:620-625(1981); Mantei等、Nature 281:40-46(1979); Levinson等、EP 117,060; 及びEP 117,058に記述されている。異種多量体の哺乳動物細胞培養物発現のために特に有用なプラスミドは、pRK5 (EP 307,247) またはpSV16B (1991年6月13日発行のPCT発行番号WO91/08291) である。

異種多量体発現のための宿主細胞の選択は、主に発現ベクターに依存する。他の考慮点は、必要とされる蛋白量である。ミリigramの量は一時的トランスフェクションによりしばしば産生可能である。例えば、アデノウイルスEIA-形質転換293ヒト胚腎細胞系は、リン酸カルシウム法の修飾によるpRK5-ベ

スのベクターを用いて一時的にトランスフェクトされ得、効率的な異種多量体発現を許容する。CDM8-ベースのベクターは、DEAE-デキストラン法によってCOS細胞をトランスフェクトするために使用され得る (Aruffo等、Cell 61:1303-1313[1990];及びZettmeissl等、DNA Cell Biol. (US)9:347-353[1990])。大量の蛋白が望まれる場合に、イムノアドヘシンは宿主細胞系の安定したトラン

スフェクションの後に発現されうる。例えば、pRK5-ベースのベクターは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) をコードし、G418に対する耐性を付与する付加的プラスミドの存在下で、モルモット卵巣 (CHO) 細胞に導入される。G418耐性のクローンは、培養において選択され得る。これらのクローンは、増大する濃度のDHFR阻害剤メトトレキセートの存在下で培養され、DHFR及び異種多量体配列をコードする遺伝子コピーの数が、共に増幅されるクローンが選択される。イムノアドヘシンがN-末端に疎水性のリーダー配列を含む場合には、それはトランスフェクトされた細胞により切断され、分泌されるであろう。より複雑な構造をもったイムノアドヘシンの発現は、固有に適合させた宿主細胞が必要となろう。例えば、軽鎖またはJ鎖等の部品は、ある種のミエローマまたはハイブリドーマ宿主細胞により与えられるであろう (Gascoigne等、前出文献; 及びMartin等、J. Virol. 67:3561-3568[1993])。

ここにおいてベクターをクローン化し、発現する為の他の適当な宿主細胞は、上述した原核細胞、酵母、または他のより高度な真核細胞である。この目的に適当な原核細胞は、グラム陰性またはグラム陽性生物等の新生細菌、例えば、腸内細菌科の、例えば、E. コリ等のエシェリヒア、エンテロバクター、エルウィナ、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ・チフィウム等のサルモネラ、セラチア・マルセスカンス等のセラチア、及びシゲラ、並びにB. スプチリス及びB. リヒエニホルミス等のバチルス (例えば、1989年4月12日発行のDD 266, 710に開示されるB. リヒエニホルミス41P)、P. アエルギノザ等のシュードモナス、並びにストレプトマイセスを含む。一つの好ましいE. コリクローニング宿主は、E. coli 294 (ATCC 31, 446) であるが



、*E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC31, 537) 及び *E. coli* W3110 (ATCC27, 325) 等の他の株も好適である。これらの例は例示的であって、限定的なものではない。W3110株は、組換えDNA生成物発酵のための一般的な宿主株であって、特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは宿主細胞は、最小限の原核性酵素を分泌するものであるべきである。例えば、W3110株は、*E. coli* W3110 27C7株の例があるように蛋白質をコードする遺伝子において遺伝的変異を生じるように修飾さ

れうる。27C7の完全な遺伝子形は、*tonA*Δ *tpr3* *phoA*ΔE15 Δ(*argF-lac*)169 *ompT*Δ *degP41karf*である。27C7株は、アメリカンタイプカルチャーコレクションにATCC No. 55, 244として、1991年10月30日付で寄託されている。別法として、1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異ペリプラズムプロテアーゼを有する*E. coli*株が採用されうる。別法として、例えば、PCRまたは他の核酸ポリメラーゼ反応のクローニング方法も好適である。

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核性微生物も、異種多量体コードベクターの為のクローニング及び発現宿主である。サッカロマイセス・セレビシアまたは通常のパン酵母は、下等真核性宿主微生物の内では最も普通に使用されている。しかしながら、シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach and Nurse, *Nature* 290:140[1981]; 1985年5月2日発行のEP 139,383) ; クルイベロマイセス宿主 (米国特許第4,943,529号 ; Fleer等、前出文献) 例えば*K. lactis* (*K. lactis*) [MW98-8C, CBS683, CBS4574 ; Louvencourt等、*J. Bacteriol.* 737(1983)]、*K. fragilis* (*K. fragilis*) (ATCC12, 424)、*K. bulgaricus* (*K. bulgaricus*) (ATCC16, 045)、*K. wickerhamii* (*K. wickerhamii*) (ATCC24, 178)、*K. waltii* (*K. waltii*) (ATCC56, 500)、*K. drosophilae* (*K. drosophilae*) (ATCC36, 906 ; Van den Berg等、前出文献)、*K. thermotolerans* (*K. thermotolerans*)、及び*K. marxianus* (*K. marxianus*)

us)等;ヤロウイア(yarrowia)[EP 402,226];ビキア・パストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna等、J. Basic Microbiol. 28:265-278[1988]) ;カンジダ;トリコダルマ・リーシア(*Trichoderma reesia*)[EP 244,234];ニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*) (Case等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263[1979]) ;シュワンニオマイセス属(*Schwanniomyces*) 例えばシュワンニオマイセス・オクシデンタリス(1990年10月31日発行のEP 394,538) ;並びに糸状菌類、例えば、ニューロスボラ(*Neurospora*)、ペニシリウム(*Penicillium*)、トリポクラジウム(*Tolypocladium*) (1991年1月10日発行のWO 91/000357) 、及びアスペルギルス宿主、例えば、*A. ニヂュラン*ス(*A. nidulans*)

(Ballance等、Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289[1983]; Tilburn等、Gene 26:205-221[1983]; Yelton等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474[1984])及び*A. ニジェール*(*A. niger*) (Kelly and Hynes, EMBO J. 4:475-479[1985])等の多くの他の属、種、及び株が、普通に入手可能であり、また有用である。

グリコシル化異種多量体の発現に好適な宿主細胞は、複細胞的微生物から誘導される。そのような宿主細胞は、複雑な処理及びグリコシル化活性が可能である。原則的には、任意のより高度な真核性細胞培養物が、脊椎動物であるか無脊椎動物であるかに関わらず使用可能である。無脊椎動物細胞の例は、植物及び昆虫を含む。多くのバキュロウイルス株及び変異体並びに対応する許容される昆虫宿主細胞、例えば、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*) (イモムシ)、アエデス・アエギプチ(*Aedes aegypti*) (蚊)、アエデス・アルボピクタス(*Aedes albopictus*) (蚊)、ドロソフィラ・メラノガステル(*Drosophila melanogaster*) (ミバエ)、及びボンビックス・モリ(*Bombyx mori*)が同定されている。例えば、Luckow等、Bio/Technology 6:47-55(1988); Miller等、Genetic Engineering, Selow等編、Vol.8(Plenum Publishing, 1986)pp. 277-279;及びMaeda等、Nature 315:592-594(1985)参照。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えばアウトグラフィ・カリフォルニカ(*Autographa californica*)

NPVのL-1変異体及びボンビックス・モリNPVのBm-5株が、公的に入手可能であり、この様なウイルスは、本発明に従って、特にハポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのためにウイルスとして使用され得る。

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト及びタバコ等の植物細胞培養物が宿主として使用され得る。典型的には、植物細胞は、予め異種多量体DNAを含むように操作された細菌、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のある種の株と共に培養することによってトランスフェクトされる。A. ツメファシエンスとの植物細胞培養物の培養の間に、異種多量体をコードするDNAは植物細胞宿主に移動されてトランスフェクトされ、適切な条件下では異種多量体DNAを発現するであろう。更に、植物細胞に適合する制御及びシグナル配列、例えば、ノパリンシンターゼプロモーター、及びポリアデニル化シグナル配列等が入手可能である。Depicker等、J. Mol. Appl.

Gen. 1:561(1982)。加えて、T-DNA 780の上流領域から単離されたDNA断片は、組換えDNA含有植物組織において、植物発現可能な遺伝子の転写水準を活性化または増大することが可能である。1989年6月21日発行のEP 321,196。

好ましい宿主は、脊椎動物細胞であり、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は近年では常法になっている (*Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Patterson編[1973])。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) により形質転換されたサル腎臓CV1；ヒト胚腎臓系 (293または懸濁培養における生育についてサブクローン化された293細胞、Graham等、J. Gen. Virol. 36:59[1977])；仔ハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL 10)；モルモット卵巣細胞／-DHFR (CHO、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216[1980])；マウスセルトリー細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251[1980])；サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VE

RO-76、ATCC CRL-1587) ; ヒト頸部悪性腫瘍細胞 (HeLa、ATCC CCL2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL34) ; バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL1442) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065) ; マウス乳癌 (MMT 060562、ATCC CCL51) ; TRI細胞 (Mather等、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68[1982]) ; MRC5細胞 ; FS4細胞 ; 及びヒトヘパトーマ系 (Hep G2) である。

宿主細胞は、本発明の上記発現またはクローニングベクターによりトランスフェクトされ、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために適切に修正した慣用の栄養培地中で培養される。使用される宿主細胞に依存して、トランスフェクションはそのような細胞に適切な標準的技術を使用して行われる。Sambrook等の前出文献の1. 82節に記述されるように塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションが、原核細胞または実質的に細胞壁障壁を有する他の細胞について一般に使用される。アグロバクテリウム・ツメファシエンシスによる感染は、Shaw等、Gene

23:315(1983)及び1989年6月29日発行のW0 89/05859に記述されるように、ある種の植物細胞の形質転換に使用される。更に、植物は、1991年1月10日発行のW0 91/00358に記述される様に、超音波処理を使用してトランスフェクトされてもよい。

細胞壁を持たない哺乳動物細胞については、Graham and van der Eb, Virology 52:456-457(1978)のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。哺乳動物細胞宿主系の形質転換の一般的側面は、1983年8月16日発行の米国特許第4,399,216号においてAxxelにより記述されている。酵母への形質転換は、典型的には、Van Solingen等、J. Bact. 139:946(1977)及びHsiao等、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76:3829(1979)の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞に導入する他の方法、例えば、核のマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、完全細胞との細菌プロトプラスト融合、またはポリブレン、ポリオルニチン等の多価陽イオンも使用され得る。哺乳動物細胞の形質転換のための種々の技

術については、Keown等、Methods in Enzymology (1989)、Keown等、Methods in Enzymology 185:527-537(1990)、及びMansour等、Nature 336:348-352(1988)を参照。

本発明の異種多量体ポリペプチドの産生に使用される原核性細胞は、Sambrook等の前出文献に一般的に記述されているように、適当な培地において培養される。

本発明の異種多量体ポリペプチドの産生に使用される哺乳動物宿主細胞は、種々の培地中で培養されうる。商業的に入手可能な培地、例えば、Ham F10 (Sigma)、最小必須培地 ([MEM]、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、ダルベッコの修飾イーグル培地 ([DMEM]、Sigma) は、宿主細胞の培養に好適である。加えて、それらの開示の全てをここに参考として取り入れる、Ham and Wallace, Meth. Enz. 58:44(1979); Barnes and Sato, Anal. Biochem. 102:255(1980); 米国特許第4,767,704号; 第4,657,866号; 第4,927,762号; 第4,560,655号; WO 90/03430; WO 87/00195; 米国再審査特許第30,985号または米国特許第5,122,469号に記述されているいずれの培地も宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれも必要に応じて、ホルモン類及び/または他の成長因子 (インシュリン、トランスフェリン、または上皮成長

因子等)、塩類 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩等)、緩衝剤 (HEPES等)、ヌクレオシド (アデノシン及びチミジン等)、抗生物質 (ゲンタマイシン<sup>TM</sup>剤等)、微量元素 (通常、マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される) 及びグルコースまたは同等なエネルギー源等が補充されてもよい。他のいずれの必要な補充剤も、当業者に既知の適切な濃度で含まれてもよい。温度、pH等の培養条件は、発現に選択された宿主細胞について以前に使用された条件であり、また当業者には明らかであろう。

哺乳動物細胞培養物の生産性を最大にするための原則、プロトコール、及び実際の技術は、一般的には Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編、IRL Press, 1991に見い出し得る。

この開示において引用される宿主細胞は、培養物中の細胞、並びに宿主動物内にある細胞を包含する。

#### 4. 異種多量体の回収

好ましくは異種多量体は、一般に分泌されたポリペプチドとして培養培地から回収されるが、それが分泌シグナルを持たずに直接に産生された場合には宿主細胞溶解物から回収されてもよい。異種多量体が膜結合性である場合には、適当な洗浄剤（例えば、トライトン-X 100）を使用して膜から開放されうる。

異種多量体がヒト由来のもの以外の組換え細胞において産生された場合には、ヒト由来の蛋白質またはポリペプチドを全く含有しない。しかしながら、異種多量体について実質的に均質な調製物を得るために、該異種多量体を組み換え細胞蛋白質またはポリペプチドから精製する必要がある。最初の工程として、培養培地または溶解物が、粒状の細胞破片を除くために通常遠心分離される。

抗体定常領域を有する異種二量体は、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィーによって都合良く精製され、ここでアフィニティクロマトグラフィーは、好ましい精製技術である。異種多量体がC<sub>H</sub>3領域を含む場合には、Bakerbond ABX™ レジン（J. T. Baker, Phillipsburg, NJ）が、精製のために有用である。蛋白質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、

逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースでのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオンレジンでのクロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラム等）、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿等も、回収されるポリペプチドに依存して利用可能である。アフィニティリガンドとしての蛋白質Aの適性は、キメラにおいて使用されるイムノグロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。蛋白質Aは、ヒトγ1、γ2、またはγ4重鎖に基づくイムノアドヘシンの精製に使用されうる（Lindmark等、J. Immunol. Meth. 62:1-13[1983]）。蛋白質Gは、全てのマウスアイソタイプ及びヒトγ3について推奨される（Guss等、EMBO J. 5:1567-1575-

[1986])。アフィニティリガンドが結合される担体は、多くの場合アガロースであるが、他の担体も利用可能である。調整多孔質ガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定した担体は、アガロースで達成されるよりも速い流速及び短い処理時間を可能とする。イムノアドヘシンの蛋白質AまたはGアフィニティカラムに対する結合条件は、Fc領域の性質、即ちその種及びアイソタイプに全く依存する。一般に適切なリガンドが選択された場合に、条件設定されない培養液からの直接的な効率的結合が起こる。イムノアドヘシンの顕著な一つの特徴は、ヒトγ1分子について、蛋白質Aの結合容量が同じFc型の抗体に比べてやや減少することである。結合されたイムノアドヘシンは、酸性pH（3.0またはそれ以上）において、あるいは穏和なカオトロビズム塩を含む中性pHの緩衝溶液のいずれかにおいて効率的に溶出される。このアフィニティクロマトグラフィー工程は、>95%の純度の異種二量体調製物を生じうる。

#### 5. 異種多量体の使用

異種多量体について、多くの治療的応用が考慮される。例えば、該異種多量体は、再指向細胞毒性（例えば腫瘍細胞の殺滅のため）、ワクチンアジュバントとして、イムノトキシンを腫瘍細胞に運ぶため、標的部位（例えば腫瘍）において酵素活性化プロドラッグを変換するため、感染症の治療のため、または免疫複合体を細胞表面レセプタに対して標的とするため等に使用され得る。

異種多量体の治療用剤型は、所望の純度を有する異種多量体を、選択され得る

生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定化剤と共に混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で貯蔵のために調製され得る（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Osol, A. 編[1980]）。許容される担体、賦形剤または安定化剤は、採用される投与量及び濃度において受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩及び多の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたはイムノグロブリン等の蛋白質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類及

び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び／またはトウイーン、プルロニクスまたはポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

異種多量体は、例えばコアセルベート技術によって、または界面ポリマー化によって調製されるマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルローズまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-〔メチルメタクリレート〕マイクロカプセル）中、コロイド状薬剤分配系（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、またはマクロエマルジョン等に捕捉されてもよい。この技術は前出のRemington's Pharmaceutical Sciencesに開示されている。

インビボ投与のために使用される異種多量体は、無菌的でなければならない。これは、凍結乾燥及び再構成に先行するかまたは引き続いて、無菌フィルター膜を通しての濾過によって容易に行われる。異種多量体は、普通には凍結乾燥形態または溶液において保存されるであろう。

治療用異種多量体組成物は、無菌的口部を有する容器、例えば、静脈内溶液用バッグ、または皮下注射針によりさし込めるストッパーを有するバイアル等に入れられる。

異種多量体投与の経路は、既知の方法に従って、静脈内、腹腔内、大脳内、筋肉内、眼内、動脈内、または病巣部内経路による注射または輸液、あるいは下記の

ような持続放出系による。異種多量体は、輸液により連続的に、または大量注射により投与される。

持続放出調製物の好適な例は、蛋白質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性担体を含み、該担体は、例えばフィルムまたはマイクロカプセル等の成型物の形態である。持続放出担体の例は、ポリエステル、ハイドロゲル〔例えば、Langer等、J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277(1980)及びLanger, Chem. Tech. 12:98-105(1982)に記述されるポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール）〕、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58



, 481)、L-グルタミン酸及びガンマエチル-L-グルタメートのコポリマー (Sidman等、Biopolymers 22:547-556[1983])、非-分解性エチレン-ビニルアセテート (Langer等、前出文献)、Lupron Depot<sup>TM</sup>等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー (分解性乳酸-グリコール酸コポリマー及びロイプロライドアセテートからなる注射可能な微小球)、並びにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(EP 133,988)を含む。

エチレン-ビニルアセテート及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、100日以上に亘って分子の放出を可能とするが、ある種のハイドロゲルは、蛋白質をより短期間で放出する。カプセル化された蛋白質が長期間体内に残った場合には、それらは37℃において水分に曝される結果として変性または凝集を起こし得て、生物学的活性の喪失及び可能性をもった免疫原性への変化を生じうる。関与する機構に依存して、蛋白質安定化の合理的な戦略が考案されうる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を介しての分子間S-S結合形成であることが分かった場合には、安定化は、スルヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の調製、適切な添加剤の使用、特異的なポリマー担体組成物の開発等により達成されうる。

持続性放出異種多量体組成物は、リポソーム的に捕捉された異種多量体も含む。異種多量体を含むリポソームは、それ自体既知の方法により調製される：DE 3,218,121; Epstein等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034(1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本出願83-118008; 米国特許第4,485,045及び4,544,545号; 並びにEP 102,324。通常、リポソームは、

微小な(約200-800オングストローム)単層型であって、その脂質含量は、約30%コレステロール以上であるが、至適な異種多量体療法のために選択された比率が調整されうる。

治療的に採用される異種多量体の有効量は、例えば、治療対象、投与経路、及び患者の症状等に依存するであろう。従って、治療医は、投与量の力価を測定し、至適治療効果を得るために必要とされる投与経路を修正する必要がある。典型

的な1日投与量は、上述の因子に依存して、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $10\text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上までの範囲に亘るであろう。典型的には臨床医は、投与量が所望の効果を達成するに至るまで異種多量体を投与するであろう。この治療の進行は、慣用のアッセイ法にて容易に監視されうる。

ここに記述される異種多量体は、酵素イムノアッセイにも使用されうる。これを行うためには、異種多量体の一方のアームは、結合が酵素阻害を生じないように酵素上の特定のエピトープに結合するよう設計され、異種多量体の他方のアームが所望の部位において高い酵素密度が保証されるように固定化担体に結合するよう設計されうる。この様な診断用異種多量体の例は、IgGと共にフェリチンに対する特異性を有するもの、及び、西洋ワサビペーオキシダーゼ（HRP）と共に例えばホルモンに対して結合特異性を有するものを含む。

異種多量体は、2部位イムノアッセイにおいて使用するために設計されうる。例えば、2種の二重特異的異種多量体は、分析対象蛋白質の2つの異なるエピトープに結合するよう生成され、一方の異種多量体は不溶性担体に対する複合体に結合し、他方は指示酵素に結合する。

異種多量体は、癌等の種々の疾患のインビトロまたはインビボ免疫診断に使用され得る。この診断的使用を容易にするために、異種多量体の一方のアームは、腫瘍関連抗原に結合するに、また他方のアームは検出可能なマーカー（例えば放射性核種を結合するキレート化剤）に結合するよう設計され得る。例えば、腫瘍関連抗原CEAに加えて二価ハプテンに対して特異性を有する異種多量体は、直腸及び甲状腺悪性腫瘍の造影に使用され得る。異種多量体について、他の非治療的、診断用途は、熟練した実務家には明らかであろう。

診断適応用について、異種多量体の少なくとも一方のアームは、典型的には直

接または間接的に検出可能な残基により標識されるであろう。検出可能な残基は、直接または間接的に検出可能なシグナルを生成しうるものであり得る。例えば、検出可能な残基は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{36}\text{S}$ または $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体；フルオレseinイソチオシアネート、ローダミンまたはルシフェリン等の蛍光性または化学発光性化合物；またはアルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダ

ーゼ若しくは西洋ワサビパーオキシダーゼ（H R P）等の酵素であり得る。

異種多量体を別個に検出可能な残基に接合するためにはこの分野で既知のいずれかの方法が使用でき、例えば、Hunter等、Nature 144:945(1962)；David等、Biochemistry 13:1014(1974)；Pain等、J. Immunol. Meth. 40:219(1981)及びNygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407(1982)に記述される方法が含まれる。

本発明の異種多量体は、競合結合アッセイ、直接または間接サンドイッチアッセイ、免疫沈降アッセイ等の任意の既知のアッセイ方法において使用されうる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Technique, pp. 147-158(CRC Press, Inc., 1987)

競合結合アッセイは、限定された量の異種多量体との結合について、試験試料対象物と競合する標識標準の能力に基づく。試験試料中の分析対象物の量は、異種多量体に結合された標準の量に逆比例する。供給される標準の量の決定を容易にするために、異種多量体は一般に競合の前または後に不溶化され、如かして異種多量体に結合した標準及び分析対象物は、未結合のまま残る標準及び分析対象物から都合良く分離される。

異種多量体は、各々が検出されるべき試料の異なった免疫原性部分またはエпитープに結合可能である2種類の分子の使用を含むサンドイッチアッセイについて特に有用である。サンドイッチアッセイにおいては、試験試料分析対象物は、固体支持体に固定化された異種多量体の第1のアームにより結合され、その後に第2のアームが分析対象物に結合し、如かして不溶性の3部分複合体を形成する。米国特許第4,376,110号参照。異種多量体の第2のアームは、それ自体が検出可能な残基により標識されていてもよく（直接サンドイッチアッセイ）、あるいは検出可能な残基により標識された抗-イムノグロブリン抗体を使用して測定されてもよい（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの一つの

型は、検出可能な残基が酵素であるE L I S Aアッセイである。

下記は、本発明を実施するための特定の実施態様の例である。実施例は、例示

のみを目的として提供されるもので、本発明の範囲を限定することを何ら意図するものではない。ここにおいて引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、前出または後述に関わらず、それらの全体をここに参考として取り入れる。

#### 実施例

Chamow等、J. Immunol. 153:4268(1994)によって既に記述されているヒト化抗-CD3/CD4-IgGキメラ間のC<sub>H</sub>3境界部分を、回収される異種多量体の百分率が最大となるように操作した。突起を空隙に入れたもの (protuberance-into-cavity) と天然型のC<sub>H</sub>3変異体をヒト化抗-イムノアドヘシンキメラ (Ab/Ia) 抗-CD3/CD4-IgGに形成を支配する能力について比較した。

如かして、ヒト化抗-CD3抗体重鎖のC<sub>H</sub>3領域及びCD4-IgGに、不一致のオリゴヌクレオチドを用いて部位指向的変異生成により変異を構築し (Kunkel等、Methods Enzymol. 154:367[1987]及びP. Cater, Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. Mcpherson編、IRL Press, Oxford, UK, pp.1-25[1991])、ジデオキシヌクレオチド配列決定により確認した (Sanger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463[1977])。下記表4及び図7参照。

表 4

最も好ましい変異体	
抗-CD3のCH3	CD4のCH3
T366Y	Y407T
T366W	Y497A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S

好ましい変異体	
F405W	T394S

残基T366は、相手のCH3領域の残基Y407の水素結合距離の範囲内にある。実際に、残基T366に対する主要な分子間接触は残基T407に対するもので、逆もまた同様である。突起を空隙に入れた対の一つは、一方のCH3領域のT366Y及び相手の領域のY407Tの相互変異生成によりこれらの残基を逆にし、如かして境界部分の側鎖の体積を維持して生成された(図9)。変異は、天然型残基、次いでKabat番号システム(Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 5版[1991])を使用して位置、次いで置換残基を一文字コードにより示される。複数の変異は、単一の変異構成要素をコロンで分離して示される。

抗-CD3軽(L)及び重(H)鎖変異体をコードするファージミド(phagemid)(Shalaby等、J. Exp. Med. 175:217[1992]及びRodrigues等、Int. J. Cancer (Suppl.) 7:45[1992])を、既に記述されているように(Chamow等、J. Immunol. 153:4268[1994])、CD4-IgG変異体をコードするファージミド(Byrn等

Nature 344:667[1990]) と共にヒト胚腎臓細胞293Sに共トランスフェクトした。手法は図8に例示されている。トランスフェクトしたファージミドDNAの量を固定し、一方で異なるDNAの比率を、Ab/Iaキメラの収率が最大となるように変化させた。Ia:H鎖:L鎖入力DNA(15 $\mu$ gの全量)の比率(質量で)は、次の通りに変化させた: 8:1:3; 7:1:3; 6:1:3; 5:1:3; 4:1:3; 3:1:3; 1:0:0; 0:1:3。

生成物を、SDS-PAGE分析に先立ってスタフィロコッカス蛋白質A(Po rSep A, BioProcessing Ltd. UK)を用いてアフィニティ精製し、次いで走査L A S E R密度測定を行った(図10A-10E)。L鎖が制限的となることを避けるために、H鎖DNAを越える過剰のL鎖を使用した。生成物の同定は、P V D F膜(Natsudaira, J. Biol. Chem. 262:10035[1987])上のエレクトロブロッ ティング及び引き続くアミノ末端配列決定により行った。

L鎖の為のファージミドの、H鎖及び天然型C<sub>H</sub>3を取り込んだIaの為のファージミドと一緒に共トランスフェクションは、予想されたとおりのAb/Iaキメラ、IgG及びIa同種二量体生成物の混合物を生じた(Chamow等, J. Immunol. 153:4268[1994])。図10A参照。抗体H及びL鎖、またはIaをコードする入力DNAの分画が大きいほど、回収される対応する同種二量体の分画が高くなる。Ia:H:Lの6:1:3の入力DNA比は、54.5%のAb/Iaキメラを、Ia同種二量体(22.5%)及びIgG(23.0%)の同様な分画を伴って生じた。これらの比は、各鎖の等モル量の発現及び引き続く無作為のH鎖の取り合わせから、分析方法に先入観を入れずに行った結果: 50%Ab/Iaキメラ、25%Ia同種二量体及び25%IgGとよく一致した。

天然型C<sub>H</sub>3を含む鎖とは対照的に、抗-CD3 H鎖及びCD4-IgGが、Y407Tの空隙及びT366Yの突起変異をそれぞれ含む場合にAb/Iaキメラが92%を越える収率をもって回収された(図10B)。Ab/Iaキメラの同様な収率が、H鎖に突起、またIaに空隙をもった相互変異を導入した場合にも得られた(図10C)。両方の場合において、単量体は突起を含むが空隙を含まない鎖について観察された。何らか一つの理論に限定されるものではない

が、

T366Y突起は、Y407Tの空隙よりも同種二量体形成に対してより混乱性のものであると考えられる。Ab/Iaハイブリッドの分画は、突起及び空隙の両者の大きさの増大 (Ab T366W、Ia Y407A) によっては顕著には変化しなかった。第2の突起及び空隙対 (Ab F405A、Ia T394W) は、Ia T394W突起変異体の同種二量体形成の予想されない傾向を相殺するために、Ia入力DNAの小さい分画を使用して、71%Ab/Iaキメラを生じた (図10D)。2つの独立した突起を空隙に入れた変異対 (Ab T366Y:F405A、Ia T394W:Y407T) の組合せは、Ab T366Y、Ia Y407A対以上にはAb/Iaハイブリッドの収率を改善しなかった (図10C及び10Eを比較のこと)。

Ab T366Y、Ia Y407A変異対を用いて得られたAb/Iaキメラ分画は、試験した範囲に亘って入力DNAの比に実質的に依存しなかった。更に、夾雑する分子種は、モノS HR5/5カラム (Pharmacia, Piscataway, NJ) 上でのイオン交換クロマトグラフィー (20mMトリス-HCl中の0-300mM NaCl、pH8.0) により、Ab/Iaキメラから容易に除去された。このことは、Ab及びIaの相対的発現レベルが過渡的発現系ほどには容易に操作できない場合に、安定な細胞系を使用してのより大量のAb/Iaキメラの調製を予言している。

確認された突起を空隙に入れた変異体は、可能性ある10種の主要な分子種 (Suresh等、Methods Enzymol. 121:210[1990]) から得られる生成物の混合物の複雑さを4種またはそれ未満に減少することにより、Fc-含有BsAbの可能性ある応用を拡大することを予言している。T366及びY407は完全に保存され、またIgG<sub>1</sub>の境界部分のC<sub>H</sub>3領域における他の残基は高度に保存的であることから (図6参照)、T366Y及びY407T変異体対は、ヒトIgGアイソタイプ以外の異種多量体の創製のためにも有用であろうことが期待される。

配列表

( 1 ) 一般情報

( i ) 出願人 : ジェネンテック インコーポレーテッド

( ii ) 発明の名称 : 異種多量体ポリペプチド類の製造方法

( iii ) 配列の数 : 16

( iv ) 通信住所 :

( A ) 名宛人 : ジェネンテック インコーポレーテッド

( B ) 通り : 460 Point San Bruno Blvd

( C ) 都市名 : South San Francisco

( D ) 州名 : カリフォルニア

( E ) 国名 : アメリカ合衆国

( F ) 郵便番号 : 94080

( v ) コンピュータが読み込むことができる形態 :

( A ) 媒体種 : 3.5 インチ、720 Kb フロッピーディスク

( B ) コンピュータ : IBM PC 互換機

( C ) オペレーティングシステム : PC-DOS / MS-DOS

( D ) ソフトウェア : ウィンパットイン ( WinPatIn ) ( ジェネンテック )

( vi ) 本出願のデータ :

( A ) 出願番号 :

( B ) 出願日 : 1996 年 2 月 5 日

( C ) 分類 :

( vii ) 先の出願のデータ :

( A ) 出願番号 : 08 / 399106

( B ) 出願日 : 1995 年 3 月 1 日

( viii ) 弁護士 / 代理人情報

( A ) 氏名 : Lee, Wendy M.

( B ) 登録番号 : 00,000

( C ) 参照 / ドケット番号 : P0927PCT



(ix) 通信情報 :

(A) 電話 : 415/225-1994

(B) ファクシミリ : 415/952-9881

(C) テレックス : 910/371-7168

(2) 配列番号 : 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 108 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(xi) 配列 : S E Q I D N O : 1

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
341				345					350					355
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				360					365					370
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp
				375					380					385
Gly	Glx	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
				390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				405					410					415
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
				435					440					445
Pro	Gly	Lys												
				448										

(2) 配列番号 : 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 108 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(xi) 配列 : S E Q I D N O : 2

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
341				345					350					355	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				360					365					370	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp	
				375					380					385	
Gly	Glx	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	
				390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				435					440					445	
Pro	Gly	Lys													
				448											

( 2 ) 配列番号 : 3 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 8 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 3

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
341				345					350					355	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				360					365					370	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp	
				375					380					385	
Gly	Glx	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
				390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				435					440					445	
Pro	Gly	Lys													
				448											

( 2 ) 配列番号 : 4 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 1 3 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 4

```
Gly Asn Thr Phe Arg Pro Gln Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
341          345          350          355
Glu Glu Leu Ala Leu Asx Glx Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala
          360          365          370
Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly
          375          380          385
Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg
          390          395          400
Gln Glx Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
          405          410          415
Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser
          420          425          430
Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys
          435          440          445
Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys
          450          453
```

( 2 ) 配列番号 : 5 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 7 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 5

```
Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp
341          345          350          355
Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe
          360          365          370
Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu
          375          380          385
```

Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro  
390 395 400  
Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala  
405 410 415  
Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His  
420 425 430  
Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val  
435 440 445  
Ser Tyr  
447

( 2 ) 配列番号 : 6 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 1 0 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 6

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu  
341 345 350 355  
Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln  
360 365 370  
Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu  
375 380 385  
Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys  
390 395 400  
Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr  
405 410 415  
Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val  
420 425 430  
His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser  
435 440 445  
Val Asn Pro Gly Lys  
450

( 2 ) 配列番号 : 7 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 6 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q    I D    N O : 7

```
Asp Glx Asx Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
342          345          350          355

Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val
          360          365          370

Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asx Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
          375          380          385

Glx Asp Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asx Ile Ser Glx Ser
          390          395          400

His Pro Asx Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys
          405          410          415

Glu Asx Asx Trp Asx Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr
          420          425          430

His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro
          435          440          445

Lys
447
```

( 2 ) 配列番号 : 8 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 8 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q    I D    N O : 8

```
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
361          365          370          375

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          380          385          390

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asx Asp
          395          400          405

Gly Glx Pro Glx Asx Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
          410          415          420

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
          425          430          435
```

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
440 445 450  
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
455 460 465  
Pro Gly Lys  
468

(2) 配列番号 : 9 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 107 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(xi) 配列 : S E Q I D N O : 9

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
361 365 370 375  
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
380 385 390  
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
395 400 405  
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser  
410 415 420  
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
425 430 435  
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
440 445 450  
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
455 460 465  
Gly Lys  
467

(2) 配列番号 : 10 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 107 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(xi) 配列 : S E Q I D N O : 10

Gly	Gln	Pro	Arg	Glx	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
361				365					370					375	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				380					385					390	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	
				395					400					405	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				425					430					435	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				440					445					450	
Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				455					460					465	
Gly	Lys														
	467														

( 2 ) 配列番号 : 1 1 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 7 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 1 1

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	
361				365					370					375	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				380					385					390	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glx	Ser	Asn	Gly	
				395					400					405	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				425					430					435	
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				440					445					450	
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	
				455					460					465	
Gly	Lys														
	467														

( 2 ) 配列番号 : 1 2 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 7 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 1 2

```
Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
361                      365                      370                      375
Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
                      380                      385                      390
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asx Gly
                      395                      400                      405
Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asx Thr
                      410                      415                      420
Asx Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser
                      425                      430                      435
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
                      440                      445                      450
Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
                      455                      460                      465
Gly Lys
467
```

( 2 ) 配列番号 : 1 3 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 7 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q I D N O : 1 3

```
Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala
361                      365                      370                      375
Glu Glu Met Thr Lys Lys Glx Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
                      380                      385                      390
```



Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Glu	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	
					395					400				405	
Arg	Thr	Glu	Gln	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glx	Lys	Ser	
				425					430					435	
Thr	Trp	Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Phe	Ala	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	
				440					445					450	
Gly	Leu	His	Asn	His	Leu	Thr	Thr	Lys	Thr	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	
				455					460					465	
Gly	Lys														

(2) 配列番号 : 14 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 107 アミノ酸

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直線状

(xi) 配列 : S E Q I D N O : 14

Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	
361				365					370					375	
Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Val	
				380					385					390	
Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	
				395					400					405	
His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asx	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys	Thr	Ser	
				425					430					435	
Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His	Glu	
				440					445					450	
Gly	Leu	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	
				455					460					465	
Gly	Lys														

(2) 配列番号 : 15 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 107 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q    I D    N O : 1 5

```
Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg
361                               365                               370                               375

Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr
                               380                               385                               390

Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly
                               395                               400                               405

Glu Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser
                               410                               415                               420

Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp
                               425                               430                               435

Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu
                               440                               445                               450

Ala Leu His Asn His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro
                               455                               460                               465

Gly Lys
467
```

( 2 ) 配列番号 : 1 6 の情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 配列の長さ : 2 9 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 直線状

( xi ) 配列 : S E Q    I D    N O : 1 6

```
Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
451                               455                               460                               465

Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
                               470                               475                               479
```

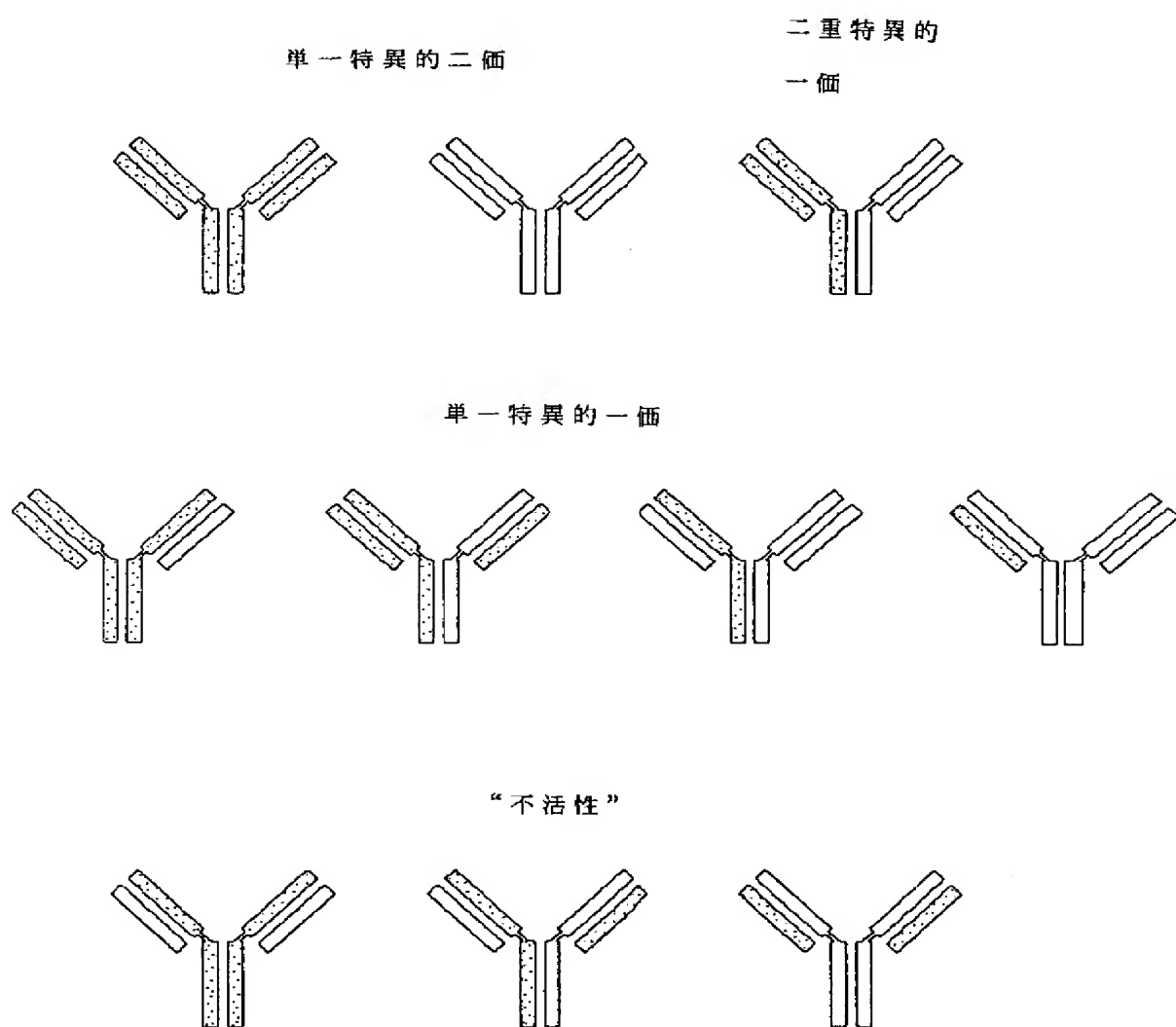


FIG. 1

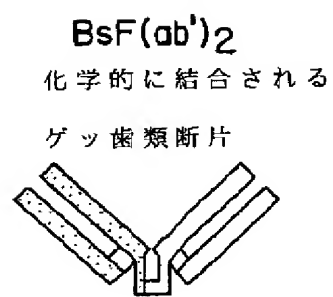


FIG. 2A

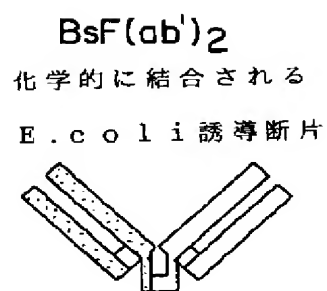


FIG. 2B

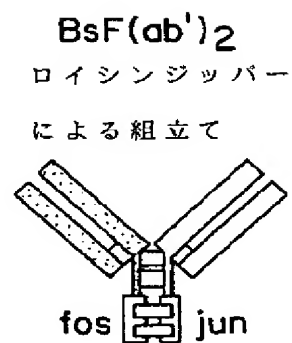
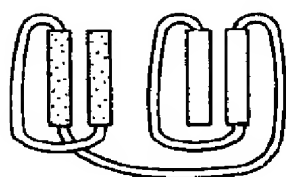
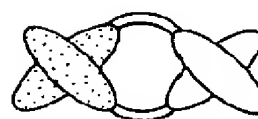


FIG. 2C



sFv 二量体

FIG. 2E



ジアボディ

FIG. 2D

レセプタ

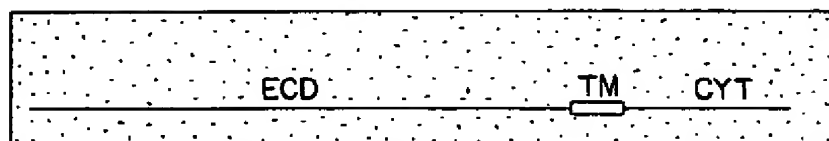


FIG. 3A

IgG1- 重鎖

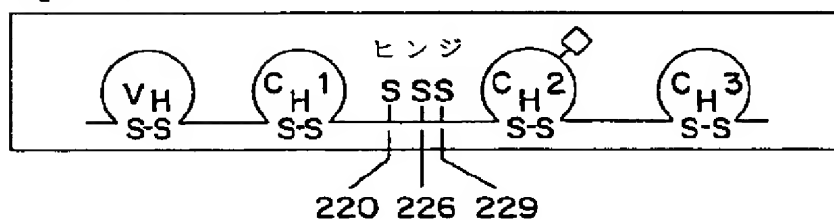


FIG. 3B

イムノアドヘシン

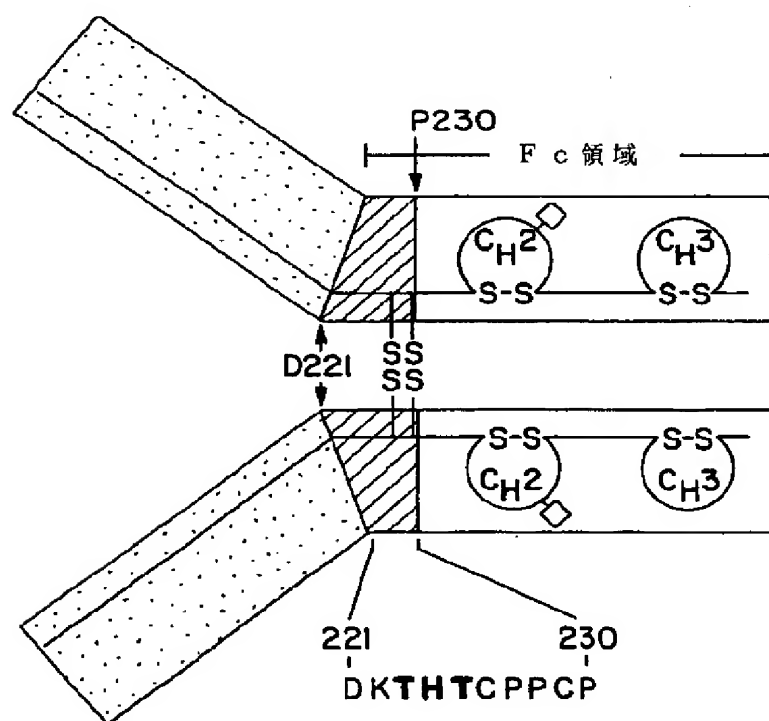


FIG. 3C

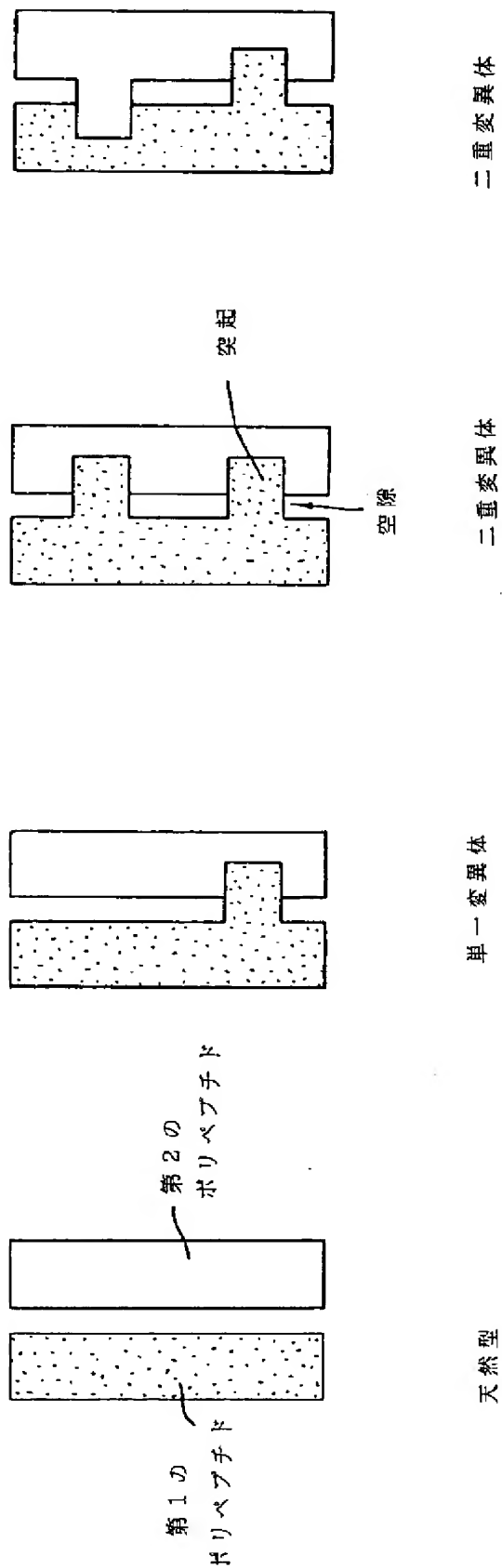


FIG.4

エッジ、インターフェース

```

-----
          B i B I B I   B i
IgG      G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
IgA      G N T F R P Q V H L L P P P S E E L A L B Z L
IgD      Q A P V K L S L N L L A S S D P - - P E A A
IgE      G P R A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K
IgM      - D Z B T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S
          350                               360

```

ミドル、インターフェース

エクステリア

```

-----
          B I B I B I B i           B   B   B
IgG      V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
IgA      V T L T C L A R G F S P K D V L V R W L Q G
IgD      S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q
IgE      R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H N
IgM      T K L T C L V T D L T T Y B S V T I S W T R Z
          370                               380

```

エッジ、インターフェース

```

-----
                      I   i   I
IgG      D - G Q P E N N Y K T T P P V/M L D S D G S
IgA      S Q E L P R E K Y L T W A S R   Q Z P S Q G T T T
IgD      R E V N T S G F A P A R P P P   Q P G S T T
IgE      E V Q L P D A R H S T T Q P R   K T K G S G
IgM      D - - G E A V K T H T B I S Z   S H P B A T
          390                               400

```

ミドル、インターフェース

エクステリア

```

-----
          B I B I B I   B i B           B           B   B   B
IgG      F F L Y S K/R L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
IgA      F A V T S I   L R V A A E D W K K G D T F S C M V G
IgD      F W A W S V   L R V P A P S P Q P A T Y T C V V S
IgE      F F V F S R   L E V T R A E W E Q K D E F I C R A V
IgM      F S A V G E   A S I C E B B W B S G E R F T C T V T
          410                               420

```

エクステリア

```

-----
          B           b   b   b
IgG      H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
IgA      H E A L P L A F T Q K T I D R L A G K
IgD      H E D - S R T L L N A S R S L E V S Y
IgE      H E A A S P S Q T V Q R A R S V N P G K
IgM      H T D L P S P L K Q T I S R P K - - -
          430                               440

```

FIG.5

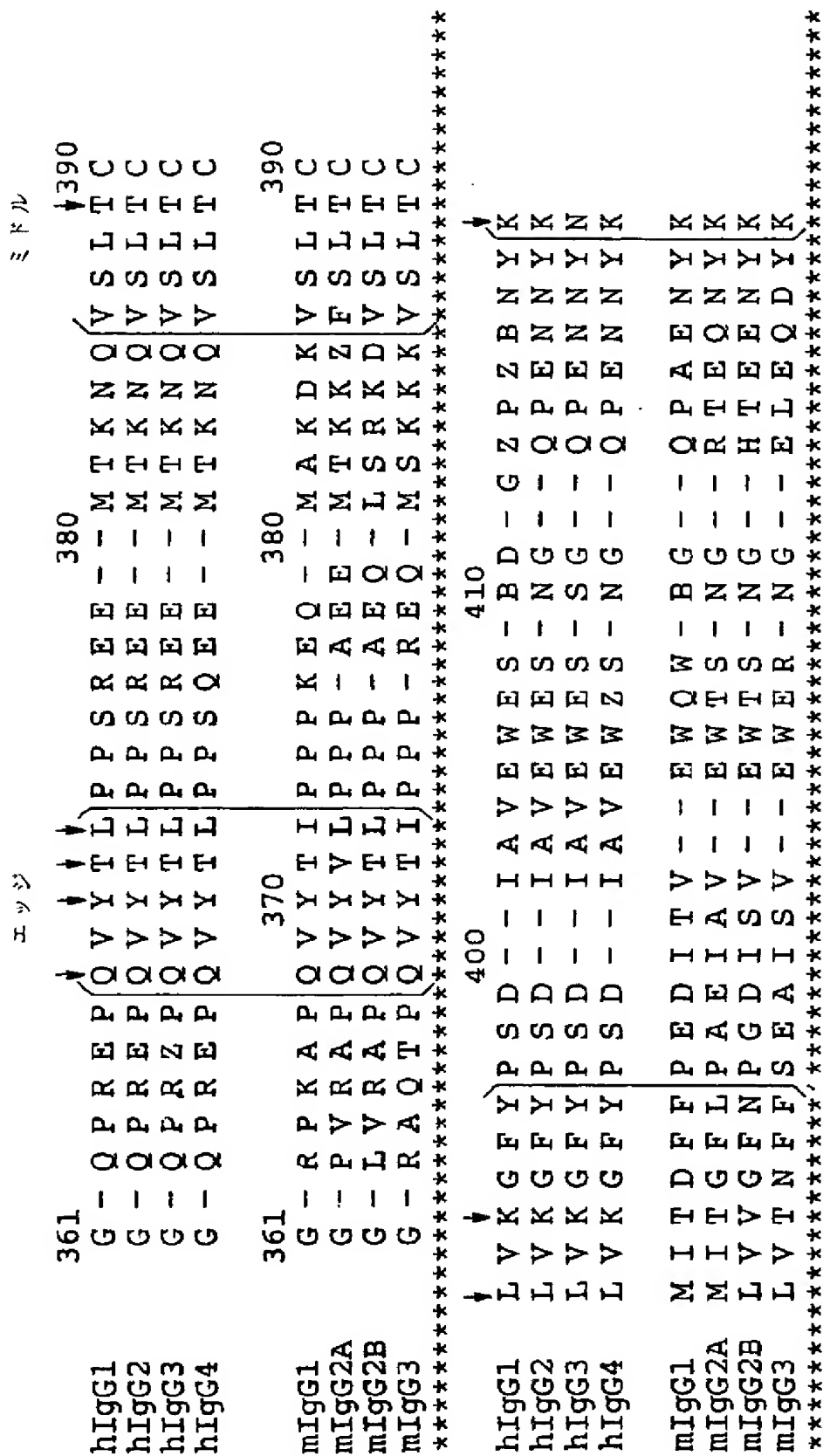


FIG.6A



**FIG. 6B**

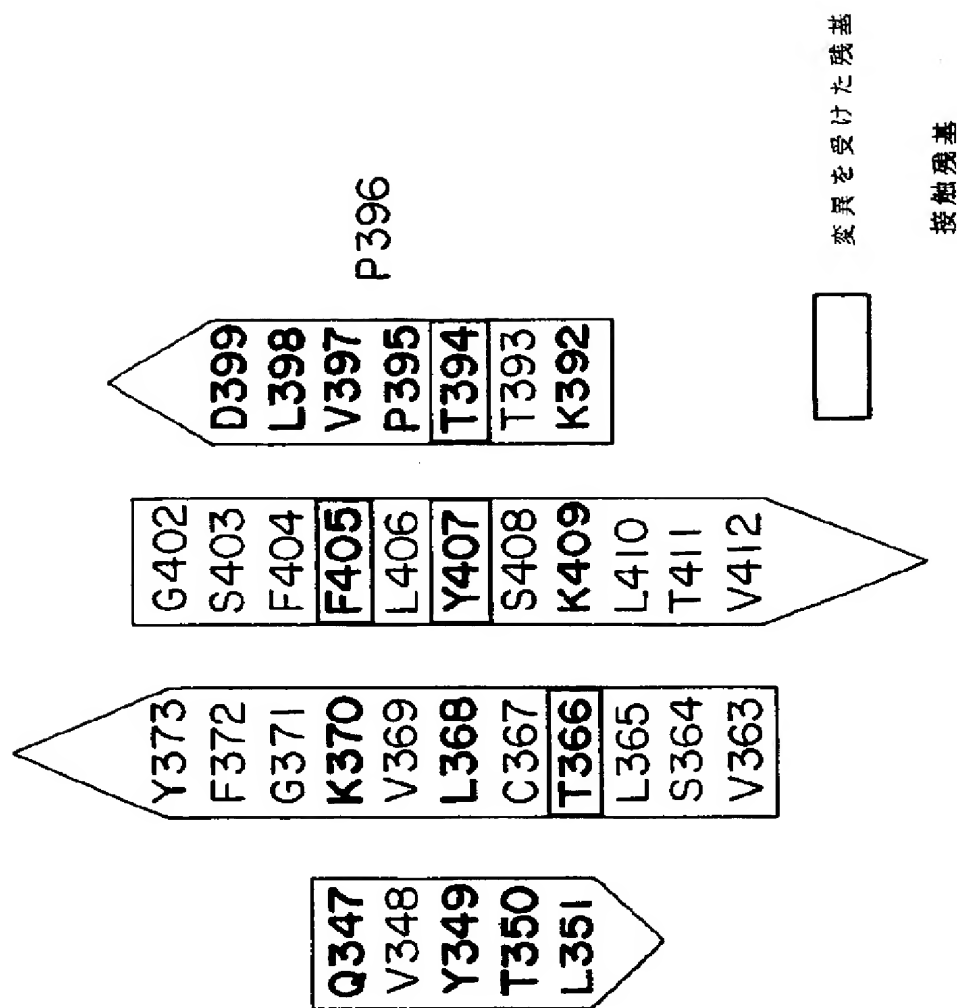


FIG.7

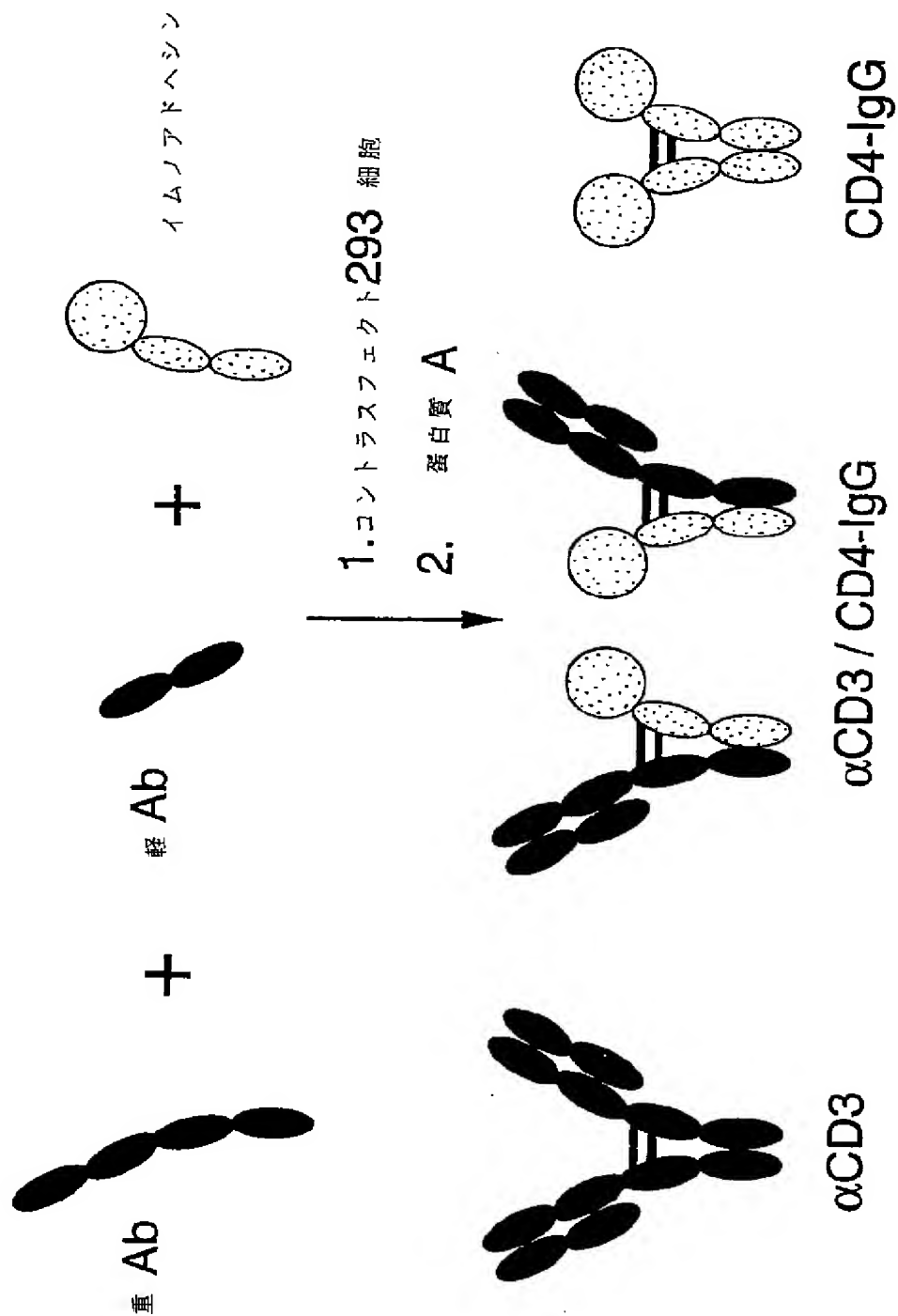


FIG.8

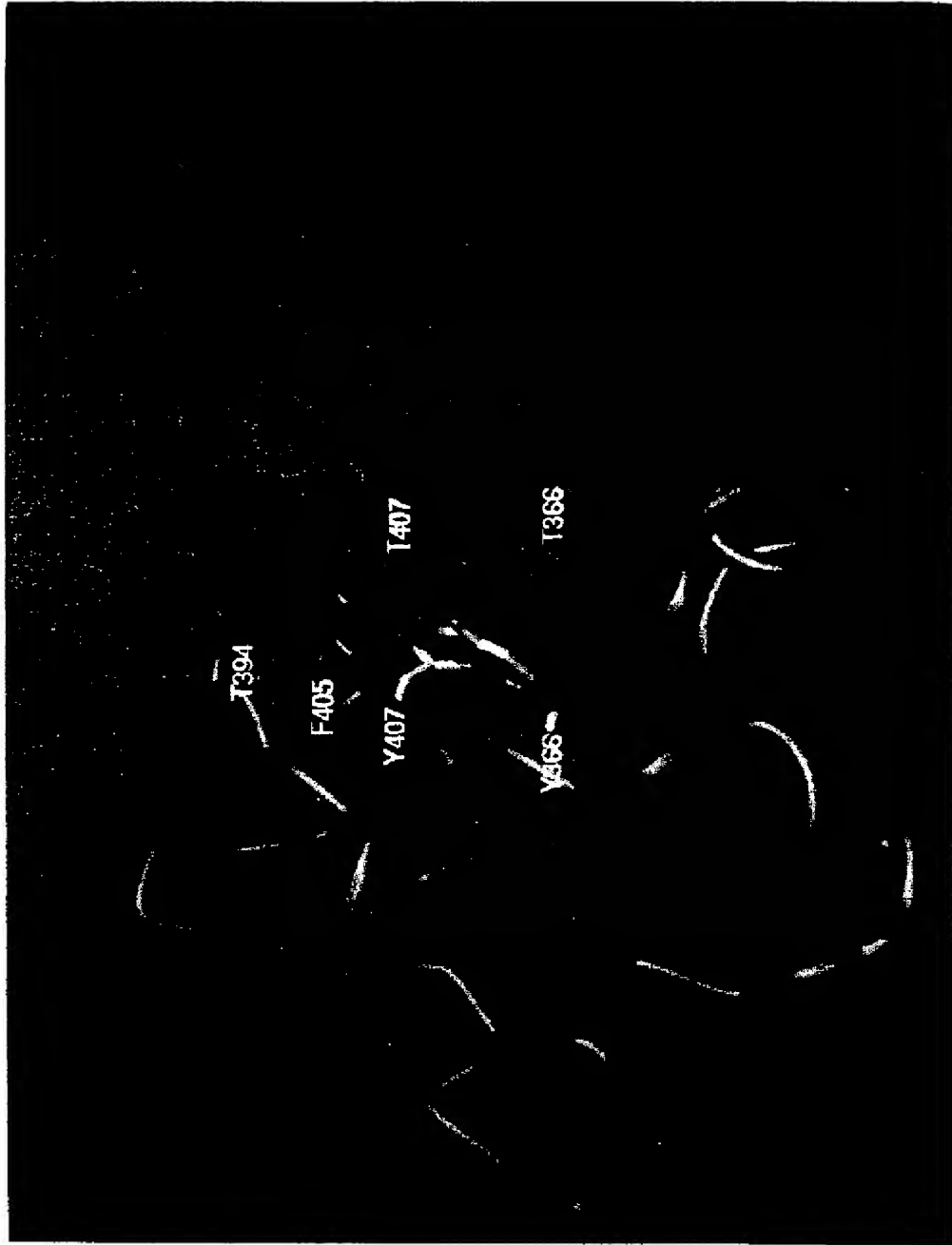
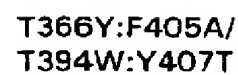


FIG. 9



WT/WT



入力 DNA の比 :  $I A : H : L$

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/US 96/01598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/13 C07K16/46 C07K17/00 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 10209 (THE WISTRA INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY) 25 June 1992 see page 4, line 15 - page 6, line 7 see page 6, line 13 - page 12, line 7 see page 13, line 3 - page 18, line 22 ---	1-38
A	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 12, 15 December 1993, BALTIMORE US, pages 6954-6961, XP002007001 MARIA L. RODRIGUES ET AL.: "Engineering Fab' fragments for efficient F(ab)2 formation in Escherichia coli and for improved in vivo stability" see abstract see page 6955, left-hand column, paragraph 2 - page 1959, left-hand column, paragraph 1 -----	1-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  28 June 1996		Date of mailing of the international search report  25.07.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Montero Lopez, B

Form PCT/ISA/211 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 96/01598

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
W0-A-9210209	25-06-92	CA-A-	2097060	05-06-92
		EP-A-	0563214	06-10-93
-----				

Form PCT/ISA/214 (patent family annex) (July 1993)

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
/(C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	ADY
C 1 2 R 1:91)			
A 6 1 K 38/00	ADY		

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

(72) 発明者 リッジウェイ, ジョン ビー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94114  
 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート #1821